

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg / Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M.D. Menger)**

**REDUKTION DER ENDOTOXIN-INDUZIERTEN  
HEPATISCHEN MIKROZIRKULATIONSSTÖRUNG UND  
ORGANDYSFUNKTION DURCH PRÄKONDITIONIERUNG  
MIT CPG-OLIGODEOXYNUKLEOTIDEN (CPG-ODN)**

als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2006

vorgelegt von:

**Jan Erik Slotta**

Geboren am 21.01.1979 in Mainz

**Meiner Familie**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2 ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>3 EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
3.1 Sepsis	9
3.1.1 Definition	9
3.1.2 Epidemiologie	10
3.1.3 Pathophysiologie	11
3.2 Lipopolysaccharid (LPS)	19
3.3 CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN)	22
3.3.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund	22
3.3.2 Klassifikation	26
3.3.3 Wirkungsmechanismen	27
3.3.4 Immunantwort	29
<b>4 ZIEL DER STUDIE</b>	<b>31</b>
<b>5 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>32</b>
5.1 Versuchstiere	32
5.2 Modell	32
5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation	32
5.2.2 Vorbehandlung und Endotoxinämie	33
5.3 Untersuchungsmethoden	34
5.3.1 Makrohämodynamik	34
5.3.2 Mikrozirkulation der Leber	35
5.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter	41
5.3.4 hepatozelluläre Exkretionsfunktion	43
5.3.5 Probenentnahme	43
5.3.6 Vollblut-Untersuchungen	44
5.3.7 Histologische Analysen - Standardfärbungen	45
5.3.8 Proteinbiochemische Analysen	46
<b>5.4 experimentelles Protokoll</b>	<b>49</b>

---

<b>5.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Makro- und Mikrozirkulation der Leber</b>	<b>51</b>
6.1.1	systemische Parameter	51
6.1.2	intravitale Fluoreszenzmikroskopie	53
<b>6.2</b>	<b>Organfunktion und -integrität</b>	<b>57</b>
6.2.1	Gallesekretion	57
6.2.2	Plasma-Aktivität der Leberenzyme	58
<b>6.3</b>	<b>Morphologie und Entzündung</b>	<b>58</b>
6.3.1	HE-Färbung	58
6.3.1	CAE-Färbung	59
<b>6.4</b>	<b>Proteinexpression</b>	<b>60</b>
6.4.1	immunhistochemische Färbungen	60
6.4.2	Western Blot	62
<b>6.5</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>7.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden</b>	<b>66</b>
7.1.1	Diskussion des Modells	66
7.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	69
<b>7.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>75</b>
7.2.1	systemische Parameter	75
7.2.2	Mikrozirkulation	76
7.2.3	Mechanismen	81
<b>7.3</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>83</b>
<b>7.4</b>	<b>Perspektive</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>100</b>
<b>11</b>	<b>VITA</b>	<b>102</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

## **Reduktion des Endotoxin-bedingten Leberschadens durch immunmodulierende CpG-Oligodeoxynukleotide**

Im Rahmen einer Sepsis stellt das Leberversagen eine gefürchtete und kritische Entwicklung des Krankheitsgeschehens dar, da es trotz aller modernen intensivmedizinischen Maßnahmen mit einer hohen Mortalität einhergeht.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie der Einfluss einer kurzkettigen synthetischen DNA-Sequenz mit einem zentralen Cytidin-Guanosin-Motiv, kurz CpG-Oligodeoxynukleotid (CpG-ODN), auf die hepatische Mikrozirkulation endotoxämischer Ratten untersucht. Die CpG-ODN-Konditionierung erfolgte sechs Tage vor Induktion der Endotoxinämie. Im Vergleich zu einem nicht-CpG-Motiv-haltigen, biologisch inerten Oligodeoxynukleotid als Kontroll-Substanz, wurde der Lipopolysaccharid-induzierte Leberschaden nach 6- und 16-stündiger Endotoxinämie untersucht. Um die Veränderungen an der Leber zu quantifizieren und Einsicht in die Wirkmechanismen zu erhalten, wurden neben der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie histologische, immunhistochemische, laborchemische sowie proteinbiochemische Methoden eingesetzt.

Sowohl die intravitalmikroskopischen, als auch die zusätzlich durchgeführten Untersuchungen zeigten für CpG-ODN-vorbehandelte Tiere im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikante Reduktion des Endotoxin-vermittelten Leberschadens. CpG-ODN-vorbehandelte Tiere wiesen eine deutlich verbesserte nutritive Perfusion, Gewebeoxygenierung und Sekretionsleistung auf. Die intrahepatische Leukozytensequestrierung und der parenchymatöse Schaden waren signifikant vermindert. In Übereinstimmung mit den intravitalmikroskopischen Ergebnissen zeigten die histologischen Untersuchungen eine signifikante Reduktion der hepatozellulären Apoptose und der sinusoidalen Leukostase. Laborchemisch konnte ein deutlicher Rückgang der Plasmaaktivität der Leberenzyme nach CpG-ODN-Behandlung im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden. Proteinbiochemisch wurde eine verminderte Expression von TRAF6, einem zentralen Protein in der Signalkaskade von Lipopolysacchariden (LPS) und CpG-ODN, und dem Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, sowie eine kompensatorische Steigerung der Expression des LPS-Rezeptors TLR4 nachgewiesen.

In separaten Experimenten wurden aufgrund der bekannten Eigentoxizität von CpG-ODN frühe und späte Effekte von CpG-ODN auf die hepatische Mikrozirkulation untersucht, sowie die Frage des Verbleibs der DNA-Sequenzen nach intraperitonealer Injektion beantwortet. Diese Versuche zeigten am ersten Tag nach CpG-ODN-Injektion ausgeprägte Mikrozirkulationsstörungen der Leber, einhergehend mit intrahepatischer Leukozytenakkumulation und hepatozellulärer Apoptose. Diese Veränderungen waren innerhalb von 6 Tagen vollständig reversibel. Durch Verwendung von fluoreszierenden CpG-ODN war ein intravital-mikroskopischer Nachweis der DNA-Sequenzen in sinusoidalen Uferzellen der Leber bis zu 6 Tage nach Applikation möglich.

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass CpG-Oligodeoxynukleotid-Präkonditionierung in niedrig gewählter Dosierung trotz initialer hepatotoxischer Wirkung protektive Einflüsse auf die hepatische Mikrozirkulation und die Endotoxin-vermittelte Leberdysfunktion haben. Diese Erkenntnisse stehen in Übereinstimmung mit einer Reihe von Veröffentlichungen über immunstimulierende Effekte von CpG-ODN. Die Mechanismen von CpG-Oligodeoxynukleotiden sind in allen Details bislang nicht abschließend aufgeklärt, jedoch fanden wir Anhalt, dass die protektive Wirkung über eine Reduktion des TRAF6-NF $\kappa$ B - Signalwegs, trotz kompensatorischer Steigerung von TLR4, vermittelt wird.

## 2 ABSTRACT

### **Reduction of endotoxin-induced liver damage by immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides**

Liver dysfunction is a critical step in sepsis-associated multi-organ failure and is associated with a high mortality, determining final outcome of the disease.

In this study, we investigated the impact of a short synthetic DNA sequence with a central cytidine-guanosine motif, a so-called CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN), on the hepatic microcirculation, liver morphology and hepatocellular function in endotoxemic rats. CpG-ODN preconditioning was performed 6 days before induction of endotoxemia. In comparison with a non-CpG-motif-containing, biologically inert DNA sequence, we analyzed endotoxin-induced liver damage at 6 and 16h after endotoxin administration. Additionally, we used histological and immunohistological stainings, and western blot analysis to quantify morphological and functional deteriorations of the liver.

Intravital microscopy and morphological analyses showed a reduction of endotoxin-induced liver damage after CpG-ODN treatment compared to controls. The improved microvascular perfusion and tissue oxygenation were associated with an increased hepatocyte secretory function. This was associated with a reduced intrahepatic leukocyte sequestration and parenchymal tissue damage in CpG-ODN pre-treated animals. In accordance with our *in vivo* data, histological analysis showed a significant attenuation of hepatocyte apoptosis and sinusoidal leukostasis. In CpG-ODN pre-treated animals, plasma activities of liver enzymes were found markedly reduced. Protein analysis showed a downregulation of TRAF6, the cytoplasmic key molecule linking CpG-ODN and lipopolysaccharide (LPS) signaling, a reduced NF $\kappa$ B activation and a compensatorily increased TLR4 expression.

Additional experiments were performed to clarify early and late effects of intraperitoneal CpG-ODN administration on liver microcirculation. By using fluorescent CpG-ODN, we could also answer the question on the fate of the intraperitoneally injected DNA sequences. These experiments showed distinct microcirculatory disturbances, coinciding with leukocyte accumulation and hepatocellular apoptosis one day after CpG-ODN administration. These alterations were entirely reversed until day 6 after administration. By intravital microscopy, we

could detect fluorescein-labeled CpG-ODN in sinusoidal lining cells until day 6 after intraperitoneal injection.

Thus, this study shows for the first time that low dosed CpG-ODN preconditioning exerts protective effects on hepatic microcirculation and endotoxin-induced liver dysfunction despite early liver toxic “side” effects. These results are in line with other recent findings on immunostimulatory effects by CpG-ODN. The exact molecular mechanisms of immune stimulation and of the resulting protective effects still remain to be elucidated in detail. However, the present study indicates that the protective effect is mediated by a downregulation of the TRAF6-NF $\kappa$ B signaling pathway despite a compensatory upregulation of TLR4.



## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Sepsis

#### 3.1.1 Definition

Die Invasion pathogener Keime in die Blutbahn mit der Überwindung der natürlichen Endothelbarriere und einer überschießenden Antwort des Organismus im Sinne einer systemischen entzündlichen Antwort wird mit dem Begriff „Sepsis“ beschrieben [BONE et al., 1992]. Obwohl der Begriff Sepsis eng mit der modernen Medizin verknüpft ist, handelt es sich um einen sehr alten medizinischen Terminus. Das Wort "Sepsis" wurde bereits von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt und leitet sich von dem griechischen *σηπω* ("faul machen") ab. Schottmüller (1867-1936) formulierte 1914 eine erste moderne Definition der Sepsis, nachdem er die Bedeutung eines infektiösen Fokus erkannt hatte: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Seiner Meinung nach hatte sich eine Therapie „... nicht gegen die im Blute kreisenden Bakterien, sondern gegen die ... frei werdenden Bakterien-Toxine zu richten...“ [SCHOTTMÜLLER, 1914]. Nach weiteren Erkenntnissen in den 80iger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde 1989 von dem amerikanischen Intensivmediziner Roger Bone (1941-1997) die heute gültige Sepsisdefinition formuliert: "Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom und die Reaktion des Organismus auf diese Invasion" [BONE et al., 1989].

Angesichts der Komplexität des Krankheitsbildes der Sepsis und der Ähnlichkeit zu sekundären Entzündungsreaktionen, tauchten in der Nomenklatur der Sepsis viele verschiedene Begriffe auf. 1992 veröffentlichten das American College of Chest Physicians und die American Society of Critical Care Medicine auf einer Konsensuskonferenz festgelegte Definitionen für das systemische Entzündungsreaktionssyndrom (SIRS) und die Sepsis [BONE et al., 1992]. Ziel war, die Diagnose und Therapie anhand klarer Kriterien zu erleichtern, wie auch für die Forschung eine einheitliche Nomenklatur vorzulegen (Tabelle 1).

Bakteriämie	Auftreten von Bakterien im Blut, durch eine positive Blutkultur nachweisbar
SIRS	zwei oder mehr der folgenden Kriterien (SIRS-Kriterien): 1) Hyperthermie (>38°C) oder Hypothermie (<36°C) 2) Tachypnoe (>24 Atemzüge / Minute) 3) Tachykardie (Herzfrequenz >90 Schläge / Minute) 4) Leukozytose (>12.000/μl), Leukopenie (<4000/μl) oder >10% unreife Frühformen
Sepsis	SIRS mit Verdacht auf oder gesicherter mikrobieller Ätiologie
schwere Sepsis (Sepsis-Syndrom)	Sepsis mit mindestens einem Anzeichen für Organdysfunktion: 1) Herz-Kreislauf-System: systolischer Blutdruck <90mmHg oder mittlerer arterieller Druck <70mmHg, der auf i.v.-Volumengabe reagiert 2) Niere: Ausscheidung <0.5ml/kg/h trotz adäquater Volumengabe 3) Lunge: PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> <250, oder <200, falls die Lunge das einzige versagende Organ darstellt 4) Blut: Thrombozytenzahl <80.000/μl oder Abnahme um 50% vom höchsten gemessenen Wert der letzten 3 Tage 5) ungeklärte metabolische Azidose: pH <7.30 oder ein BE ≥5mEq/l sowie ein Plasma-Laktatwert >1.5x des Normalwertes 6) adäquate Volumengabe: Lungenarterien-Wedge-Druck ≥12mmHg oder ZVD ≥8mmHg
septischer Schock	Sepsis mit Hypotension (<90mmHg oder mehr als 40mmHg unter Normaldruck des Patienten) für mindestens eine Stunde trotz adäquater Volumentherapie oder Bedarf an Vasopressoren, um den systolischen Blutdruck >90mmHg oder den mittleren arteriellen Druck ≥70mmHg zu halten
refraktärer septischer Schock	septischer Schock für mehr als eine Stunde, der weder auf Volumen- noch Vasopressorengabe anspricht
Multiorganversagen (MOV)	Versagen von mehr als einem Organ, Notwendigkeit der Intervention, um Homöostase zu erhalten

**Tabelle 1:** Terminologie entsprechend der Konsensus-Konferenz 1992

### 3.1.2 Epidemiologie

Eine epidemiologische Studie für die USA hat gezeigt, dass innerhalb der Jahre 1979-2000 insgesamt nahezu 10.5 Millionen Sepsis-Fälle registriert wurden, was ca. 1.3% aller Hospitalisationen entspricht [MARTIN et al., 2003]. Bei Behandlungskosten für einen Sepsis-Patienten von etwa 50.000 US-\$ [CHALFIN et al., 1993] wird das Gesundheits- und Versicherungswesen allein durch diese Patientengruppe mit ca. 17 Milliarden US-\$ jährlich in erheblichem Maße belastet [ANGUS et al., 2001], unabhängig von dem massiven Verbrauch von personellen Ressourcen auf Intensivstationen.

Insgesamt hat sich die Häufigkeit der Sepsis innerhalb der letzten 20 Jahre von 83/100.000 im Jahr 1979 auf 240/100.000 in 2000 nahezu verdreifacht, die Inzidenz steigt jährlich um 8.7%. Diese Zunahme von Sepsis-Fällen kann zum einen sicherlich der Tatsache zugeschrieben werden, dass durch die Festlegung klarer Kriterien [BONE et al., 1992] weit- aus mehr Fälle an Sepsis erkannt, als solche diagnostiziert und mit zunehmender elektronischer Datenverarbeitung auch als solche codiert worden sind. Zum andern spielen neben epidemiologischen Faktoren (steigendes Durchschnittsalter der Bevölkerung und eine höhere Lebenserwartung) auch die Zunahme chronischer Krankheiten, eine steigende Zahl an immungeschwächten Patienten (AIDS-Patienten, Immunsuppression, Gebrauch von Glukokortikoiden), aber auch der weit verbreitete Gebrauch von Verweilkathetern, Kunstgelenken [ZIMMERLI et al., 2004] und der mechanischen Beatmung eine große Rolle. Der oftmals unkontrollierte und ungezielte Einsatz anti-mikrobieller Pharmaka und die daraus resultierende Entwicklung mikrobieller (Multi-)Resistenzen tragen sicherlich auch zur Zunahme an schwer verlaufenden Sepsisfällen bei.

Die Mortalität hängt vom Geschlecht des Patienten sowie von genetischen, ethnologischen und sozialen Faktoren ab. Sie steigt mit zunehmendem Alter, mit einem dramatischen Anstieg ab einem Alter über 75 Jahren [ANGUS et al., 2001]. Im Rahmen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks beträgt die Mortalität 60% [BRUN-BUISSON et al., 1995], und ist damit trotz großer medizinischer Fortschritte innerhalb der letzten 10 Jahre nahezu unverändert geblieben [FRIEDMAN et al., 1998].

### **3.1.3 Pathophysiologie**

Pathophysiologische Grundlage der Sepsis ist ein septischer Herd, aus dem pathogene Keime oder Bestandteile pathogener Keime in die systemische Zirkulation gelangen und dort zu einer überschießenden Freisetzung und Aktivierung von Mediatoren führen. Dies führt nach Aktivierung des Immunsystems in letzter Konsequenz zu einer Schädigung parenchymatöser Organe als Grundlage für Organdysfunktion und Multiorganversagen als schwerster Verlaufsform einer Sepsis. Entscheidend für den Verlauf und das Fortschreiten der Sepsis beim Patienten sind weniger Anzahl und Virulenz der Erreger, als vielmehr das Ausmaß und der Ablauf der entzündlichen Reaktion [VAN DEVENTER et al., 1997]. Sepsis ist ein biphasisch ablaufendes Krankheitsbild. In der initialen hyperdynamen Phase führen Entzündungsmediatoren zu einer Vasodilatation, die jedoch durch eine Erhöhung von Herzfrequenz und kardialer Auswurfleistung unter Aufrechterhaltung eines normalen Blutdrucks kompensiert werden kann. Mit Fortschreiten der Sepsis sind die Kompensationsmechanismen überfordert und eine Hypotension stellt sich ein, die trotz intensiver Volumentherapie

persistieren kann. Diese beiden Phasen können sich bei einem Patienten mehrfach wiederholen. Der Verlauf einer Sepsis lässt sich neben der Kreislagsituation auch anhand immunologischer Faktoren in eine initiale pro-inflammatorische Phase mit Überwiegen entzündungsfördernder Mediatoren (TNF- $\alpha$ , Komplementfaktoren C3, C5a, IL-1, -2, -6, -8 und Interferon- $\gamma$ ) sowie eine späte Phase mit einem Überwiegen anti-inflammatorisch wirkender Mediatoren (IL-10, -13) einteilen.

### **3.1.3.1 Leukozyten**

Sepsis geht einher mit der Migration aktivierter Leukozyten aus dem Blutkreislauf in entzündetes Gewebe [GEISSMAN et al., 2003] und einer gesteigerten Leukozyten-Produktion im Knochenmark. Diese neu gebildeten Leukozyten werden als frisch-differenzierte oder gar unreife, undifferenzierte Frühformen ins Blut abgegeben und präsentieren sich in Form tief greifender Veränderungen im Bild peripherer Lymphozyten [HOLUB et al., 2003; MONNERET et al., 2003] und Monozyten [FINGERLE et al., 1993]. Ebenso finden sich Veränderungen in der Expression von Oberflächenmarkern (z.B. Chemokin-, TNF- $\alpha$ -, IL-1-, C5a-Rezeptoren, TLR2 und TLR4). Aktivierte Leukozyten setzen zahlreiche Proteasen frei, die bei der Bekämpfung von Infektionen eine zentrale Rolle spielen. Bei Sepsis-Patienten sind die Elastase-Konzentrationen in Blut und Bronchial-Lavage-Flüssigkeit erhöht [TANAKA et al., 1991], und tragen möglicherweise zur Entstehung von Schock und Multiorganversagen bei.

Zelluntergang durch Apoptose bei septischen Patienten variiert je nach Zelltyp. Sie ist in Blut- und Milz-Lymphozyten wie in dendritischen Zellen der Milz erhöht, bei Milz-Makrophagen und zirkulierenden Monozyten hingegen unverändert. Bei Neutrophilen im Blut und Alveolarmakrophagen ist die Apoptoserate unter septischen Bedingungen sogar erniedrigt [HOTCHKISS et al., 2001]. Fas-Ligand (FasL) [AYALA et al., 1998] und Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) [BOGDAN et al., 1997] sind im Tiermodell die beiden wichtigsten pro-apoptotischen Faktoren. Durch Caspase-Inhibitoren können Sepsis-induzierte Apoptose und Tod verhindert werden. Die Mechanismen und die Rolle der Apoptose in der Pathogenese des septischen Schocks beim Menschen sind immer noch ungeklärt.

*Ex vivo*-Versuche mit Blutzellen septischer Patienten haben eine immense Zytokinfreisetzung als Reaktion auf Mitogene bei Lymphozyten [WOOD et al., 1984] und auf LPS bei Neutrophilen [MARIE et al., 1998] und Monozyten [MUNOZ et al., 1991] gezeigt. Neutrophile von freiwilligen Gesunden haben nach LPS-Gabe ähnliche Reaktionen gezeigt.

### 3.1.3.2 Zytokine

In den letzten Jahren ist ein komplexes, sich vielfach überschneidendes, ergänzendes und regulierendes Netzwerk verschiedenster Mediatoren und Signalwege in der Pathophysiologie der Sepsis beschrieben worden. Resultierend in Endothelschaden, Entzündung, Parenchymschaden, Aktivierung von Gerinnung und Inhibierung der Fibrinolyse, führt die überschießende Aktivierung dieses Netzwerks, und die im Rahmen einer Sepsis häufig fehlerhafte Regulation zu Organdysfunktion und Versterben des Patienten.

Bei einer massiven Infektion mit gram-negativen Bakterien bewirkt die Freisetzung von Bakterien oder Endotoxinen aus der bakteriellen Zellwand in der Frühphase der Sepsis ein Erkennen dieser pathogenen Muster (PAMP) durch Oberflächenrezeptoren immunkompetenter Zellen, so genannte „pattern recognition receptors“ (PRR) und eine nachfolgende Aktivierung dieser Zellen. Diese Rezeptoren werden auf Zellen des Immunsystems, Endothel- und Epithelzellen, zum Teil auch auf parenchymatösen Zellen exprimiert [MUZIO et al., 2001]. Zu den PRR gehören neben den Toll-like Rezeptoren auch das Komplementsystem, Manno-se-bindendes Lektin, bacterial permeability increasing protein und das in der Klinik routinemäßig diagnostisch genutzte C-reaktive Protein (CRP).

pro-inflammatorisch	anti-inflammatorisch
TNF- $\alpha$	IL-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15	IL-4
Neutrophilen-Elastase	IL-10
Interferon- $\gamma$	IL-13
platelet-activating factor (PAF)	Typ II IL-1-Rezeptor
vasoaktive Neuropeptide	TGF- $\beta$
Phospholipase A2	Epinephrin
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1)	lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren
Prostaglandine	Leukotrien B4-Rezeptor-Antagonist
Prostazyklin	LBP

**Tabelle 2:** Übersicht über pro- und anti-inflammatorisch wirkende Zytokine

Das durch Rezeptoren intrazellulär angestoßene Signal bewirkt eine schnelle Produktion und Freisetzung einer Vielzahl von Botenstoffen, die das LPS-Signal vervielfachen und die zelluläre Abwehr aktivieren. Diese als Zytokine bezeichneten Mediatoren werden von verschiedenen weißen Blutzellen, Makrophagen und Endothelzellen freigesetzt. Neben TNF- $\alpha$  ist eine Vielzahl von Interleukinen (IL) und Prostaglandinen an der Aktivierung der entzündlichen Antwort beteiligt (Tabelle 2).

Die Freisetzung verschiedener Mediatoren, die zu einer generellen Aktivierung des Immun- und Gerinnungssystems führen, soll gleichzeitig über anti-inflammatorisch wirksame Mediatoren die inflammatorische Gesamtantwort auf das Pathogen regulieren und koordinieren; im Rahmen einer Sepsis ist diese Koordination der Entzündungsreaktion jedoch gestört.

Aus Experimenten mit rekombinanten pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ ), Antikörpern gegen Zytokine und Knockout-Mäusen wurde zunehmend bekannt, dass Zytokine vor Infektionen schützen. Ähnliche Ansätze, mit dem Ziel, Infektionen und toxischen Schock näher zu untersuchen, zeigten hingegen letale Wirkungen verschiedener Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , -12, -18, IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF und HMGB-1). Dies zeigt die Komplexität des Zytokin-Netzwerks und die duale Wirkung verschiedener Mediatoren (Protektion versus Toxizität). Bei septischen Patienten werden pro-inflammatorische Zytokine im Überfluss gebildet, und sind im Blut nachweisbar [CAVAILLON et al., 2003], während sie bei Gesunden dort nicht zu finden sind. Zell-assoziierte Zytokine können aber auch dann nachgewiesen werden, wenn sie im Plasma noch nicht nachweisbar sind. Der Nachweis von Zytokinen im Serum ist demnach als Diagnostikum nicht verwertbar [CAVAILLON et al., 1992].

Neben Zytokinen finden sich bei einer Sepsis erhöhte Plasmakonzentrationen an Histamin, freigesetzt von Mastzellen und Basophilen nach Komplementaktivierung und Freisetzung von Anaphylatoxinen (C3a, C5a) [BRACKETT et al., 1990]. Während exogen zugeführtes Histamin oder selektive H2-Rezeptor-Agonisten vor Endotoxinschock schützen [NAKAMURA et al., 1997], verstärken die Anaphylaktotoxine die Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskelzellen.

Pro-inflammatorische Zytokine induzieren die Synthese von Phospholipase A2, einer induzierbarer Isoform der Cyclooxygenase (COX), 5-Lipoxygenase, und Azetyltransferase. Diese tragen zur Synthese von Eicosanoiden (Prostaglandinen (PG) und Leukotrienen (LT)) und Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) bei. Diese Faktoren wirken über spezifische Rezeptoren, vermitteln Entzündung, indem sie den Gefäßtonus verändern und den Blutfluss und die Gefäßpermeabilität erhöhen. Die Stimulierung der induzierbaren Form der NO-Synthase (iNOS) führt zur Freisetzung großer Mengen NO, das für die Sepsis-assoziierte Hypotension und Mortalität verantwortlich gemacht wird [ANNANE et al., 2000]. NO-Überschuss trägt zudem über Induktion von Apoptose zur Entwicklung eines mikrovaskulären Schadens, vaskulärer Hyporeaktivität und Organdysfunktion bei [SHARSHAR et al., 2003].

Während einer Sepsis werden in großen Mengen anti-inflammatorisch wirkende Zytokine und lösliche Rezeptoren gebildet. Sie vermindern die Produktion pro-inflammatorischer

Zytokine und schützen im Tiermodell vor Sepsis und Endotoxinschock. Diese Effekte, die in Abhängigkeit von Dosis, Zeit und Ort der Expression variieren, sind für Interleukin-10 gut untersucht. Solche zweiseitigen Effekte sind ebenso für TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, -6 und -13 bekannt. IL-6 beispielsweise induziert ein großes Spektrum an Akut-Phase-Proteinen, die die Immunreaktion unterstützen, und führt zu myokardialer Depression [PATHAN et al., 2004]. Gleichzeitig wirkt es über die Induktion von IL-10 anti-inflammatorisch.

Weiterhin sind Neuromediatoren, Katecholamine und  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon von großer Bedeutung in der Kontrolle der Entzündung, indem sie die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen oder deren Signalwege hemmen [SEVERN et al., 1992; DELGADO HERNANDEZ et al., 1999].

### **3.1.3.3 Gerinnung**

Entzündung und Gerinnung sind zwei eng miteinander verflochtene Komponenten. Klinisch zeigen Sepsis-Patienten oft niedrige Thrombozytenzahlen, erhöhte D-Dimere und Fibrinogenspaltprodukte als Anzeichen einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) [LEVI et al., 1993]. Intravaskuläre Thrombosen, charakteristische Kennzeichen einer lokal ablaufenden Entzündungsreaktion, helfen möglicherweise, eindringende Mikroorganismen einzudämmen und ihre Ausbreitung über die Blutbahn in andere Gewebe zu verhindern. Intravaskuläre Fibrinablagerungen und Thrombosen können aber auch wichtige Merkmale einer systemischen Reaktion sein. IL-6 und andere Mediatoren aktivieren die Gerinnung über die Induktion von Gewebefaktor, der zusammen mit Faktor VII die Gerinnungsfaktoren V und X aktiviert. Folge ist die Aktivierung sowohl des intrinsischen wie extrinsischen Anteils des Gerinnungssystems. Die intravasale Gerinnung wird weiterhin durch eine veränderte Funktion des gerinnungshemmenden Protein C - Protein S - Signalwegs, sowie durch eine Verminderung an Antithrombin und Protein C gesteigert. Die Fibrinolyse hingegen wird durch erhöhte Plasmaspiegel von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 gehemmt. Somit spielen intravaskuläre Fibrinablagerung, Thrombose und Blutungsneigung eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Sepsis. Die Aktivierung des Kontakt-Systems während einer Sepsis trägt mehr zur Hypotension als zur disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) bei.

### **3.1.3.4 Endothel**

Als Hauptursache für das Entstehen der Organdysfunktion wird die Schädigung des Endothels verantwortlich gemacht [GRANDEL et al., 2003]. Leukozytäre Mediatoren und Plättchen-Leukozyten-Fibrin-Thromben können zum Endothelzellschaden beitragen, aber das

Endothel scheint auch eine aktive Rolle in diesem Prozess zu spielen. Stimuli, wie  $\text{TNF-}\alpha$ , verursachen in Endothelzellen die Produktion und Freisetzung von Zytokinen, prokoagulatorischen Mediatoren, Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF), Stickstoffmonoxid (NO) und anderen Mediatoren. Zusätzlich bewirken regulierte Zell-Adhäsions-Moleküle das Adhären von Neutrophilen an Endothelzellen. Diese Antworten können Phagozyten an entzündete Orte locken und deren antimikrobielle Aktivität anstoßen. Die Aktivierung von Endothelzellen führt zudem zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, mikrovaskulären Thrombosen, Aktivierung der Gerinnung und Hypotension. Als Folge von Endothelzell-Schwellung, einer verringerten Verformbarkeit zirkulierender Erythrozyten, Leukozyten-Thrombozyten-Fibrin-Thromben oder Kompression durch Ödemflüssigkeit wird das Kapillarlumen verengt, was die Thrombusbildung entsprechend der Virchow'schen Trias noch verstärkt. Die reduzierte Anzahl funktionell perfundierter Kapillaren führt zu einer Abnahme der Gewebeoxygenierung. Der zelluläre Gehalt an ATP und Anti-Oxidantien sinkt, die Produktion von Laktat steigt. Folgen sind Organdysfunktion, Zellschädigung und Zelluntergang.

### **3.1.3.5 Multiorganversagen**

Die Wege, die zum Organversagen während Sepsis führen, beinhalten unter anderem die Hoch-Regulierung entzündlicher Antworten und des neuroendokrinen Systems [SINGER et al., 2004]. Bei Überlebenden erholt sich das Organversagen spontan und das Gewebe zeigt ein morphologisch normales Erscheinungsbild. Patienten mit überschießender Infektion oder auch schwerem Trauma und anderen schwerwiegenden Krankheiten entwickeln oft klinische und laborchemische Anzeichen eines Multiorganversagens (MOV), auch wenn die versagenden Organe nicht direkt vom ursprünglichen Insult betroffen waren. Dieses Organversagen wird traditionell dem Effekt entzündlicher Mediatoren zugeschrieben, die Kreislaufveränderungen und nachfolgend Gewebehypoxie und Gewebeschaden verursachen. Dennoch ist bei Überlebenden das Organversagen nicht irreversibler Natur, erstaunlicherweise auch in den Organen, deren Zellen ein eingeschränktes regeneratives Potential haben (Niere, Herz). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich die Histologie von wieder erhaltenen Organen oft normal präsentiert, mit nur wenig oder gar keiner Apoptose und Nekrose [HOTCHKISS et al., 1999]. Diese Befunde legen den Verdacht nahe, dass die Organdysfunktion weniger auf strukturelle, als vielmehr auf funktionelle Beeinträchtigungen des Organs zurückzuführen ist. Da mit zunehmender Schwere der Sepsis der Sauerstoffverbrauch des Gewebes abnimmt [KREYMANN et al., 1993], die Sauerstoffspannung hingegen steigt [BOEKSTEGERS et al., 1991], scheint im Rahmen einer Sepsis eine mangelhafte Sauerstoffutilisation Ursache für die Organdysfunktion zu sein. Erschwert wird diese Verwertungsstörung jedoch sicherlich durch die zusätzliche Abnahme der Anzahl perfundierter Kapillaren [DE BACKER et al., 2002]



und die damit verbundene Kumulation saurer und toxischer Metabolite. Brealey und Mitarbeiter konnten bei Sepsis-Patienten zeigen, dass trotz gleichzeitiger Hemmung der Atmungskette eine Aufrechterhaltung des Gewebe-ATP mit dem Überleben assoziiert ist [BREALEY et al., 2002]. Mangels alternativer ATP-Quellen lässt sich vermuten, dass Zellen ihren Metabolismus reduzieren können, um ATP einzusparen. Singer und Mitarbeiter bieten den Erklärungsversuch an, dass ein Multiorganversagen einen Versuch des Organismus darstellt, im Rahmen kritischer Krankheiten das Überleben der Zellen zu sichern, indem über Zytokine und Hormone Energiereserven zu Ungunsten des Metabolismus eingespart werden [SINGER et al., 2004].

Die Leber ist für die Entwicklung des Multiorganversagens von entscheidender Bedeutung. Neben ihrer Funktion in der Regulierung der Leukozytenzahlen [SHI et al., 2001] und als immunkompetentes Organ [KNOLLE et al., 2000], trägt sie durch ihre metabolischen, sekretorischen und synthetischen Leistungen entscheidend zur Homöostase bei. Ein fulminantes Leberversagen ist ein klinisches Syndrom, das durch die schnelle Entwicklung einer hepatischen Enzephalopathie und einen deutlichen Abfall der Lebersyntheseleistung gekennzeichnet ist. Ohne Lebertransplantation liegt die Mortalität bei über 90% [MAS et al., 1997]. Die von der Leber während einer Entzündung und während Sepsis synthetisierten Akut-Phase-Proteine tragen zu der pro-koagulatorischen und anti-fibrinolytischen Gerinnungsstörung bei, die entscheidend für die Entwicklung des Multiorganversagens und das Überleben des Patienten ist [RING et al., 2000; DHAINAUT et al., 2001]. Das primäre Leberversagen resultiert aus der Schädigung der Hepatozyten infolge mangelhafter Oxygenierung und entzündlicher Leukozyteninfiltration und manifestiert sich laborchemisch in einer Erhöhung der Lebertransaminasen, einem erhöhten Laktatspiegel und Hypoglykämie. Die in ihrer Sekretionsleistung eingeschränkten Hepatozyten bilden vermindert Gerinnungsfaktoren und verstärken somit indirekt die im Rahmen der Sepsis auftretende Verbrauchskoagulopathie. Cholestase und Ikterus entstehen als Folge der mangelhaften Sekretionsleistung der Leber [MOSELEY, 2004] und führen ihrerseits zum Entstehen einer hepatischen Enzephalopathie.

### **3.1.3.6 Therapie**

Eine vollständige Sanierung des Infektionsfokus als kausale Therapie ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung einer schweren Sepsis oder des septischen Schocks. Als chirurgische Maßnahmen kommen unter anderem die Entfernung von Implantaten, Drainage von Abszessen, Wunderöffnung und Nekrektomie, sowie eine operative Behandlung von Peritonitis, Anastomoseninsuffizienz und Ileus infrage. Nach chirurgischer Therapie bedarf der Patient einer intensivmedizinischen Überwachung.

Eine frühzeitige intravenöse kalkulierte, am mikrobiologischen Resistenzmuster sowie am Risikoprofil des Patienten orientierte Antibiotikatherapie reduziert die Letalität bei Patienten mit Bakteriämie und Sepsis. Die Behandlung sollte nach Abnahme von Blutkulturen, jedoch frühest möglich (innerhalb einer Stunde) nach Diagnosestellung der Sepsis erfolgen. Das gewählte Antibiotikaregime sollte alle 48-72 Stunden anhand klinischer und mikrobiologischer Kriterien neu evaluiert werden, um das antimikrobielle Spektrum zu verengen und damit das Risiko von Resistenzen, Toxizität und Kosten zu reduzieren.

Die supportive Therapie zielt auf eine hämodynamische Stabilisierung mit dem Ziel des Erreichens eines adäquaten zellulären  $O_2$ -Angebotes. Eine Volumensubstitution ist die erste Maßnahme zur hämodynamischen Stabilisierung. Volumenersatz mit kristalloiden oder kolloidalen Lösungen erhöht im septischen Schock das Herzzeitvolumen und das systemische Sauerstoffangebot. Nach der gegenwärtigen Datenlage können sowohl kristalloide als auch kolloidale Lösungen gegeben werden. Entsprechend den Leitlinien der AWMF ist bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock eine zentralvenöse Sauerstoffsättigung ( $ScvO_2$ )  $>70\%$  anzustreben. Besteht trotz Volumentherapie weiterhin ein eingeschränktes Herzzeitvolumen, so ist Dobutamin das Katecholamin der ersten Wahl. Ziel ist ein arterieller Mitteldruck von  $>65\text{mmHg}$ . Kann dieser nicht erzielt werden oder die Organperfusion nicht aufrechterhalten werden, sollten vasopressorische Katecholamine (bevorzugt Noradrenalin) zur Anwendung kommen.

Die Entscheidung zur Intubation und Beatmung sollte bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock großzügig gefällt werden. Zu den Indikationen gehören schwere Tachypnoe (Atemfrequenz  $>35\text{min}^{-1}$ ), muskuläre Erschöpfung und ein Sättigungsabfall auf  $<90\%$  trotz Sauerstoffinsufflation. Es sollte versucht werden, die oximetrische Sauerstoffsättigung bei über  $90\%$  zu halten.

Eine kontinuierliche intravenöse Applikation von Insulin zur Einstellung der Blutglukose-Werte auf  $4.4$  bis  $6.1\text{mmol/l}$  ( $80$ - $110\text{mg/dl}$ ) reduziert bei postoperativen Intensivpatienten, die mechanisch beatmet werden, die Inzidenz und die Sterblichkeit an septischem Multiorganversagen. Eine intensivte Insulintherapie zur Wiederherstellung einer Normoglykämie sollte bei jedem postoperativen Intensivpatienten vom Aufnahmezeitpunkt an durchgeführt werden [VAN DEN BERGHE et al., 2001].

Prophylaktische Maßnahmen beinhalten die selektive Darm-Dekontamination (SDD), die nachgewiesenermaßen die Rate an nosokomialen Infektionen bei Intensivpatienten reduziert und bei Patienten mit voraussichtlich längerer Beatmungsdauer ( $>48\text{h}$ ) zur Prophyla-

xe von Infektionen empfohlen wird. Eine frühe orale bzw. enterale Ernährung führt bei chirurgischen Patienten mit Operationen am Gastrointestinaltrakt zu einer Verminderung von Infektionen und der Aufenthaltsdauer im Krankenhaus. Unter dem Schlagwort Immunonutrition wird der perioperative Einsatz von immunmodulierenden Sondennahrungen (Arginin,  $\omega$ -3-Fettsäuren, Nukleotide) bei elektiven chirurgischen Patienten mit gastro-intestinalen Tumoren oder Polytrauma-Patienten, die enteral ernährt werden können, empfohlen.

Im Rahmen klinischer Studien über adjunktive Therapien kamen Antikörper gegen mikrobielle Toxine, pro-inflammatorische Zytokine und Rezeptoren, verschiedene anti-inflammatorische und immunsupprimierende Medikamente, sowie rekombinante Gerinnungsfaktoren zum Einsatz. Die meisten untersuchten Agenzien haben keinen Einzug in die Klinik gehalten und werden in den Leitlinien nicht empfohlen. Lediglich der Einsatz von rekombinantem aktiviertem Protein C (rhAPC, Drotrecogin alpha, 24 $\mu$ g/kg KG/h) hat sich durchgesetzt. APC verfügt über anti-inflammatorische, anti-thrombotische und pro-fibrinolytische Aktivität und senkt bei Patienten mit schwerer Sepsis und Organversagen die Letalität signifikant [BERNARD et al., 2001].

## 3.2 Lipopolysaccharid (LPS)

LPS ist ein Glykolipid, das in der äußeren Zellmembran aller gram-negativen Bakterien vorkommt. Bei *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) besteht die äußere Zellmembran zu drei Vierteln aus LPS. Es ist sowohl für die Zellstruktur und –integrität, aber auch für Nahrungstransport und Interaktion des Bakteriums mit der Umgebung von Bedeutung. LPS ist ein hitzestabiles Molekül, das bei Vermehrung oder Tod von Bakterien (z.B. durch Antibiotika) in großen Mengen freigesetzt wird. Chemisch besteht LPS aus einer O-spezifischen Kette, einem hydrophilen, polaren zentralen Polysaccharid-Anteil, und einem hydrophoben, unpolaren Lipid-Anteil, der als Lipid A-Anteil bezeichnet wird [Abb. 1A; LUDERITZ et al., 1966]. Die Primärstruktur des Lipid A-Anteils verschiedener Bakterienarten ist aufgeklärt worden; die synthetische Herstellung des Lipid A-Anteils von *E. coli*-LPS erlaubt es, die biologische Aktivität und die Wirkungsmechanismen von LPS zu untersuchen.

LPS besitzt die Eigenschaft, das Immunsystem zu aktivieren und eine massive Entzündungsreaktion hervorzurufen. Beim Menschen reichen schon kleinste Mengen im Nanogramm-bereich aus, um die gleichen Symptome hervorzurufen, wie sie beim septischen Schock auftreten, einschließlich Katecholamin-pflichtiger und –resistenter Hypotonie, Komplementaktivierung und Gerinnungsstörungen. Diese Symptome führen in ihrer Gesamtheit

letztendlich zu Herz-Kreislauf-Versagen und zum Tod [MICHIE et al., 1988; VAN DEVENTER et al., 1990].

Bereits vor über einhundert Jahren war LPS als potentes bakterielles Toxin bekannt, und wurde Endotoxin genannt. Heute weiß man, dass LPS die Hauptursache für das Auftreten der Symptome bei schwerer Sepsis und generalisierter Entzündungsreaktion darstellt. Einige Forschungsprogramme streben daher die Neutralisierung von LPS oder seine Eliminierung aus der Blutbahn bei Patienten mit Sepsis an.

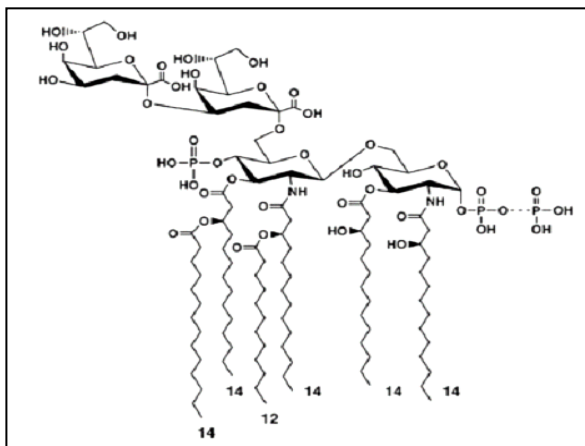
Das Auftreten von LPS in der Blutbahn (=Endotoxämie) tritt jedoch nicht nur als Folge von bakteriellem Zerfall auf, sondern in vielen anderen Situationen beeinträchtigter Immunkompetenz, wie Trauma, Verbrennungen, großen operativen Eingriffen oder Situationen beeinträchtigter intestinaler Perfusion mit konsekutiver Bakterientranslokation aus dem Darm-Lumen in die Blutbahn [LJUNGHUSEN et al., 1996; BUTTENSCHOEN et al., 2000+2001].

Der hauptsächliche Pathogenitätsfaktor von LPS ist das immense Potential, durch Produktion und Freisetzung großer Mengen des gewebeschädigenden  $\text{TNF-}\alpha$ , massive Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Es gibt zudem eine Reihe von Hinweisen, dass LPS als Kofaktor in der Ätiologie vieler Erkrankungen beteiligt ist [NOLAN et al., 1975, 1989], wie beispielsweise der alkoholischen Leberzirrhose [MATHURIN et al., 2000] oder der primär biliären Zirrhose [HOPF et al., 1989].

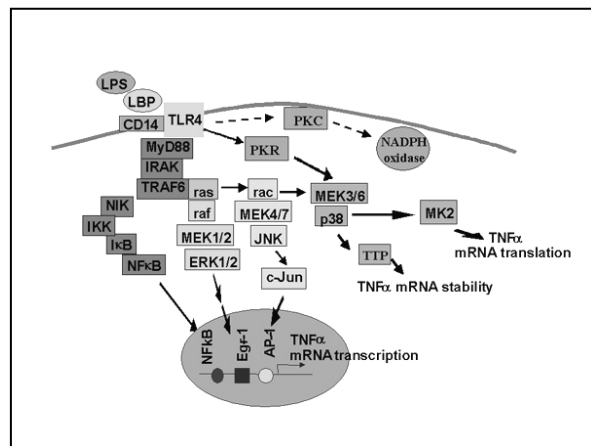
In geringen Konzentrationen wirkt LPS jedoch nicht toxisch. Es stellt vielmehr ein hochpotentes immunstimulierendes und –modulierendes Agens dar. Geringe Mengen haben positive Wirkungen auf die Homöostase, einschließlich Fieber und Aktivierung des Immunsystems. Durch diese stimulierenden Effekte induziert LPS eine unspezifische Resistenz gegen virale und bakterielle Infektionen; eingedrungene Mikroorganismen können schneller und effektiver eliminiert werden. Die Präkonditionierung durch LPS hat sich in verschiedenen tierexperimentellen Studien protektiv bei Ileus [SCHWARZ et al., 2002] oder zerebraler Ischämie [FURUYA et al., 2005] erwiesen.

Nach Freisetzung von LPS aus der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, bildet es einen Komplex mit dem Plasmaprotein „LPS-bindendes Protein“ (LBP). Dieses findet sich physiologischerweise im Blut, und wird bei Entzündungen von der Leber als Akut-Phase-Protein vermehrt synthetisiert und als 60kDa-Protein freigesetzt [SCHUMANN et al., 1990]. Diese vermehrte Produktion und Sekretion werden durch pro-inflammatorische Zytokine, wie beispielsweise IL-1, IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$  reguliert und vermittelt [GRUBE et al., 1994, WAN et al.,

1995]. LBP bindet hoch-spezifisch an den Lipid A-Anteil von LPS. Dieser Komplex wird von CD14, einem Oberflächenrezeptor auf Makrophagen und Monozyten gebunden [WRIGHT et al., 1990; HAILMAN et al., 1994]. CD14 besitzt selbst keinen zytoplasmatischen Anteil, der eine Signalkaskade anstoßen könnte, sondern interagiert vielmehr mit einem weiteren, relativ neu entdeckten Oberflächenprotein, Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), und bildet mit diesem einen Komplex. Das Binden des LPB-LPS-Komplexes an CD14/TLR4 führt zu einer Aktivierung der entsprechenden Zellen, letztendlich vermittelt durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF $\kappa$ B) und Stresskinasen (ERK, JNK, p38 MAPK; Abb. 1B) [JIANG et al., 2002]. Diese vermitteln im Zellkern die Transkription und nachfolgende Sekretion von TNF- $\alpha$  und anderen Mediatoren [WRIGHT et al., 1990; HAILMAN et al., 1994].



**Abb. 1A:** Strukturformel von E. coli-LPS  
(Quelle: <http://www.biochem.duke.edu/Raetz/fig2.htm>)



**Abb. 1B:** LPS-Signalkaskade  
(Quelle: <http://www.comparative-hepatology.com/content/3/s1/s31/figure/F1>)

LBP ist für die Produktion und Sekretion von TNF- $\alpha$  nicht notwendig, sondern dient vielmehr dem Binden von freiem LPS im Blutstrom und dessen Transfer zu den entsprechenden immunkompetenten Zellen. Die Expression von CD14 kann durch verschiedene Stimuli angestoßen und gesteigert werden (einschließlich LPS). Die höchste Expression findet sich nach 6 Stunden [FENG et al., 2003]. Der Grad der CD14-Expression korreliert unter anderem mit dem Ausmaß eines Leberschadens [TRACY et al., 1995; JIANG et al., 2001]. Beim Menschen ist in gesunden Lebern die CD14-Expression auf Kupffer-Zellen sehr gering [TOMITA et al., 1994]. Bei verschiedenen Lebererkrankungen wird CD14 jedoch in hohem Maße exprimiert. Die Expression variiert zudem mit dem Stadium der entsprechenden Erkrankung. Der Grad der Expression wiederum beeinflusst die Empfindlichkeit gegenüber LPS [GOLENBOCK et al., 1993]. So zeigen beispielsweise transgene Mäuse, die CD14 auf Monozyten über-exprimieren, eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber LPS [FERRERO et al., 1993], während CD14-Knockout-Mäuse gegenüber LPS unempfindlich sind [HAZIOT et al., 1995]. Ebenso schützen monoklonale Antikörper gegen CD14 vor LPS-bedingter Zytokin-

Induktion und septischem Schock [GALLAY et al., 1994]. In letzter Zeit sind die LPS-bindenden Proteine – LBP, CD14 und TLR4 – zunehmend ins Zentrum der Forschung gerückt, um ihre Beteiligung bei verschiedenen Formen von Lebererkrankungen zu klären. Das Binden des LPS-LPB-Komplexes an den CD14-TLR4-Komplex führt zwar zu einer Aktivierung der entsprechenden Zelle, jedoch reguliert ein komplexes Wechselspiel anderer Faktoren (TNF- $\alpha$ , IL-1, -10) die letztendliche Reaktion auf LPS [SU et al., 2002a]. Bei sehr hohen LPS-Plasmakonzentrationen werden die Reaktionen durch CD14-unabhängige Signalwege vermittelt [HAZIOT et al., 1998].

Nicht nur Kupffer-Zellen und Makrophagen, sondern auch glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Hepatozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten werden von LPS aktiviert und setzen entsprechende Entzündungsmediatoren frei. Unter diesen scheint TNF- $\alpha$  von entscheidender Bedeutung zu sein. So führte die Blockade der Phagozytose-Eigenschaften von Kupffer-Zellen durch Behandlung mit Gadolinium-Chlorid zu einer deutlichen Verbesserung der Leber-Mikrozirkulation und einer Reduktion des Leberschadens. Dies deutet darauf hin, dass Kupffer-Zellen, und die von ihnen freigesetzten Mediatoren den LPS-bedingten Leberschaden vermitteln [VOLLMAR et al., 1996]. Weitere Mediatoren, die als Reaktion auf LPS freigesetzt werden, sind unter anderem IL-1, IL-6 und IL-10, sowie Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Komplement-aktivierende Produkte, reaktive Sauerstoff-Spezies und verschiedene Zyto- und Chemokine.

Zahlreiche Studien haben die Bedeutung von TNF- $\alpha$  in der Pathogenese des LPS-bedingten Organschadens gezeigt. Die Gabe von TNF- $\alpha$  alleine ruft vergleichbare Organveränderungen hervor, wie sie nach der Gabe von LPS beobachtet werden [JAESCHKE et al., 2000; JOSEPHS et al., 2000; TIEGS et al., 1989]. Die vielseitigen Effekte von LPS und TNF- $\alpha$  zeigen anschaulich, wie komplex das Zusammenspiel der verschiedenen, an der Pathogenese der Sepsis beteiligten Mediatoren ist. Diese Komplexität erklärt gleichzeitig auch, warum verschiedene klinische Studien mit Antikörpern gegen einzelne Mediatoren erfolglos geblieben sind [FISHER et al., 1996; COHEN, 1999].

### **3.3 CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN)**

#### **3.3.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund**

Vor mehr als 100 Jahren beobachtete der Amerikaner William Coley, dass sich Sarkome zurückbildeten, wenn sich im Bereich des Tumors eine Infektion abspielte [COLEY, 1893].

Diese Beobachtung stellt quasi den Grundstein der Immuntherapie dar. Ausgehend von dieser Beobachtung behandelte er mehrere Patienten mit selbst hergestellten Bakterienlysaten, und er konnte bei einem Teil der Patienten mit dieser Therapie eine zeitweilige Tumoregression bewirken. Allerdings war zu seiner Zeit weder die Standardisierung der Bakterienlysate möglich, noch waren die einzelnen Bestandteile des Immunsystems identifiziert. Seine Erkenntnisse rückten zunehmend in den Hintergrund, nachdem andere Therapieansätze, wie beispielsweise die Strahlentherapie, bessere Resultate in der Tumorbildung erzielten. Wissenschaftliche Fortschritte im Bereich der Immunologie führten im Laufe der Zeit allerdings zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise bakterieller Lysate.

1984 erkannte Tokunaga, dass die immunstimulierende und antitumorale Wirkung eines Lysates aus *Mycobacterium bovis* (BCG) auf die bakterielle DNA im Lysat zurückzuführen ist [TOKUNAGA et al., 1984]. Vertebrate DNA hingegen weist keine immunstimulierenden Eigenschaften auf, wie Yamamoto 1992 zeigen konnte [YAMAMOTO et al., 1992]. Begründet liegt dies im Aufbau des Erbgutes, das sich bei prokaryoten und eukaryoten Organismen in einigen charakteristischen strukturellen Eigenschaften unterscheidet: seit frühen Studien über Basen-Nachbarschaften innerhalb der DNA [JOSSE et al., 1961; SWARTZ et al., 1962] ist bekannt, dass im Genom vieler Vertebraten die Dinukleotid-Sequenz Cytidin-Guanosin (CpG) weitaus seltener anzutreffen ist, als sich aus der Kombination der Basen erwarten ließe. Beim Menschen, bei dem der Anteil der beiden Nukleobasen C und G bei je 20% liegt, würde man rechnerisch eine Häufigkeit für CpG von  $20\% \times 20\% = 4\%$  erwarten, die beobachtete Häufigkeit hingegen liegt bei 0.8% [BIRD, 1980], was lediglich circa 20% der zufälligen Wahrscheinlichkeit entspricht. In bakterieller DNA hingegen tritt die Basenfolge CpG mit einer Häufigkeit von 1:16 Basenpaaren auf [BIRD, 1987; RAMSAHOYE et al., 1996]. Davon ausgehend wurde vermutet, dass ein Fehlen von CpG-Motiven in eukaryoter DNA mit der DNA-Methylierung zusammenhängt: 70-80% der so genannten CpG-Motive im eukaryoten Genom sind an der 5'-Position methyliert [EHRlich et al., 1982; RAMSAHOYE et al., 2000; BIRD, 2002], bakterielle CpG-Motive jedoch nicht. Diese nicht-methylierten CpG-Motive weisen ein starkes antigenes Potential auf. Ihre Suppression durch gezielte Methylierung wird im vertebraten Organismus auf bislang noch unbekannte Weise reguliert. Ein Teilaspekt dieser Regulierung beruht wahrscheinlich auf einer gezielten Mutation von methylierten Cytosinresten. Im Rahmen der oxidativen Desaminierung beispielsweise wird Methyl-Cytosin zu Thymidin umgewandelt [BIRD, 1980]. Tatsächlich reduziert die Methylierung am Cytosinrest die immunogene Aktivität CpG-Motiv-haltiger DNA-Sequenzen [GOECKERITZ et al., 1999], beziehungsweise der Zusatz von CpG-Methylase zu bakterieller DNA inaktiviert diese [STACEY et al., 1996]. Die Tatsache, dass eukaryote DNA methyliert vorliegt, reicht jedoch alleine sicher nicht aus, um deren immunogene Inaktivität zu erklären. Sun et al. zeigten 1997, dass

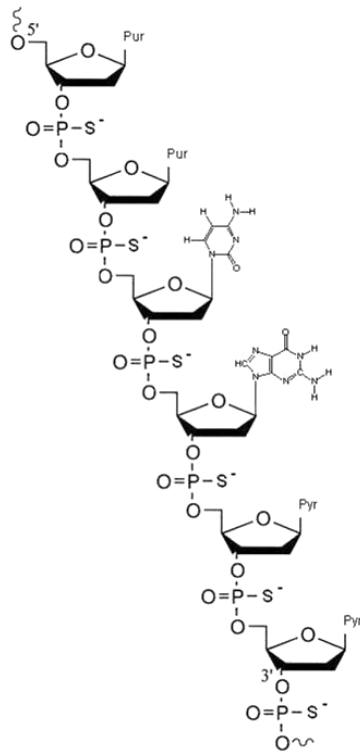
hypomethylierte DNA aus DNA-Cytosin-Methyl-Transferase-(Dnmt1)-defizienten embryonalen Stammzellen keine immunogene Aktivität besitzt [SUN et al., 1997]. Eukaryote DNA muss demnach noch weitere inhibitorische Motive exprimieren, wie beispielsweise Deoxyguanosin-(dG)-Polymere [WLOCH et al., 1998] oder GC-reiche Sequenzen [KRIEG et al., 1998]. Welche weiteren Eigenschaften für die immunogene Inaktivität eukaryoter DNA verantwortlich sind, bleibt bislang ungeklärt. Sicherlich sind jedoch der Grad der Methylierung und die Häufigkeit von CpG-Motiven dabei von großer Bedeutung [STACEY et al., 2003]. Letztendlich erlaubten diese strukturellen Unterschiede zwischen prokaryoter und eukaryoter DNA dem vertebrierten Immunsystem, im Laufe der Evolution Erkennungsmechanismen gegen Pathogene anhand ihrer DNA-Struktur zu entwickeln [HOFFMANN et al., 1999].

Die Entwicklung moderner molekularbiologischer Methoden ermöglicht die synthetische Herstellung von DNA-Sequenzen in größeren Mengen. So sind heute kurzkettige DNA-Sequenzen, so genannte Oligonukleotide, mit beliebiger Basenfolge und verschiedensten Modifikationen kommerziell zu erwerben. Oligonukleotide sind in der Regel zwischen 16 und 20 Nukleobasen lange, einzelsträngige DNA-Moleküle. Wie auch bakterielle DNA, können synthetische Oligonukleotide an den Cytosinresten unmethyliert synthetisiert werden. Krieg et al. konnten 1995 zeigen, dass unmethylierte CG-Sequenzen in einem bestimmten Basenkontext, so genannte CpG-Motive (p steht für die Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Nukleosiden), für die immunstimulierende Eigenschaften bakterieller und synthetischer DNA verantwortlich sind [KRIEG et al., 1995].

Die Möglichkeit, DNA-Sequenzen nach prokaryotem Vorbild synthetisieren zu können, die das für Bakterien typische CpG-Motiv in unmethylierter Form aufweisen, erlaubt es, die Wirkung von CpG-Motiv-haltigen DNA-Sequenzen auf das vertebrierte Immunsystem zu untersuchen. Nach den Erkenntnissen von Krieg et al. werden die Oligonukleotide mit einem modifizierten Zucker-Phosphat-Grundgerüst synthetisiert: an Stelle eines der nicht bindenden Sauerstoffatome des Phosphatrestes wird ein Schwefelatom substituiert. Diese Modifikation stabilisiert die synthetischen DNA-Sequenzen und erhöht ihre Resistenz gegenüber Serum-Nukleasen sowie die biologische Potenz der ODN [KRIEG et al., 1996]. Aufgrund der Verwendung von Desoxyribose als Zucker im Grundgerüst der DNA-Sequenz, werden diese synthetischen Sequenzen als Oligodeoxynukleotide (ODN) bezeichnet.

Entscheidend für die immunstimulierende Wirkung von CpG-ODN sind die zentralen sechs Aminobasen, die ein unmethyliertes CpG-Motiv enthalten (Abb.2). Diese Sequenz aus sechs Aminobasen wird als zentrales Hexamer bezeichnet und ist für die Interaktion mit dem „CpG-Rezeptor“, Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) verantwortlich.





**Abb. 2:** Strukturformel des zentralen Hexamers von CpG-Oligodeoxynukleotiden. Das Desoxyribose-Phosphat-Grundgerüst zeigt am Phosphatrest die Substitution eines Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom (S<sup>-</sup>). Am 5'-Ende flankieren zwei Purin-Nukleotide und am 3'-Ende zwei Pyrimidin-Nukleotide das zentrale CpG-Motiv.

Die immunstimulierenden Eigenschaften von CpG-ODN sind des Weiteren von der Sequenz der das CpG-Motiv flankierenden Nukleobasen abhängig. Krieg et al. zeigten schon 1995, dass eine optimale B-Zell-Stimulierung mit einem CpG-Motiv erzielt werden kann, das am 5' Ende von zwei Purin- und am 3'-Ende von zwei Pyrimidin-Basen flankiert ist [KRIEG et al., 1995]. Bauer und Mitarbeiter konnten an menschlichen mononukleären Zellen im peripheren Blut zeigen, dass die Wirkung der CpG-ODN sequenzabhängig ist [BAUER et al., 1999]. Yu et al. bestätigten diese Erkenntnisse 2002 an Kulturen von Maus-Lymphozyten. Sie zeigten, dass synthetische Oligonukleotide eine besonders starke immunstimulierende Wirkung aufweisen, wenn ein CpG-Motiv in einem zentralen Hexamer liegt, in dem an der 5'-gelegenen Seite zwei Purin- und 3'-gelegen zwei Pyrimidin-Basen das CpG-Motiv flankieren. Veränderungen innerhalb dieses Hexamers führen zu einer Abschwächung der immunstimulierenden Eigenschaften, Veränderungen, die mehr als drei Nukleotide vom zentralen CpG-Motiv entfernt liegen, führen hingegen zu einer Verstärkung der immunstimulierenden Eigenschaften [Yu et al., 2002].

Entscheidend für das vertebrate Immunsystem ist die Unterscheidung zwischen eigener und bakterieller DNA, um zwischen sterilem und infektiösem Gewebeschaden unterscheiden und entsprechend reagieren zu können. Die initiale Erkennung von Mikroorganismen ist für den vertebraten Organismus zur Erhaltung seiner funktionellen und strukturellen Integrität von großer Wichtigkeit. Zur Erkennung von Pathogenen besitzt das Immunsystem eine Vielzahl an mehr oder minder Liganden-spezifischen Rezeptoren, die bei Eindringen

eines Pathogens in den Organismus an essentielle fremde Komponenten binden. Dies erlaubt dem Organismus, sofort und unspezifisch auf eine mikrobielle Invasion zu reagieren und nachfolgend die spezifische Abwehr zu aktivieren.

Die Rezeptoren, die die frühe Erkennung mikrobieller Pathogene vermitteln, wurden erst in jüngerer Zeit entdeckt. Aufgrund ihrer strukturellen und genetischen Ähnlichkeit zu dem *toll*-Protein der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurden sie Toll-like Rezeptoren (TLR) genannt. *toll* hat bei der Fruchtfliege neben der dorso-ventralen Differenzierung [ANDERSON et al., 1985] die Funktion der Detektion von Antigenen und Induktion immunologischer Abwehrmechanismen [MENG et al., 1999]. Die TLR sind eine phylogenetisch sehr alte und gut konservierte Familie transmembranärer Proteine, von der mittlerweile 11 Unterformen (TLR1-11) spezifiziert sind. TLR2 und 6 vermitteln die Erkennung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien (Lipoteichonsäuren, Mannane, Peptidoglykane [SCHWANDNER et al., 1999; TAKEUCHI et al., 1999]), TLR3 bindet Doppelstrang-DNA [ALEXOPOULOU et al., 2001], TLR5 Flagellin [GEWIRTZ et al., 2001] und TLR9 erkennt CpG-Motive bakterieller DNA [HEMMI et al., 2000]. Den TLR kommt somit eine große Bedeutung bei der frühen Erkennung Pathogen-assoziiierter molekularer Muster (PAMP) und der Induktion der akuten entzündlichen Antwort zu. Sie bilden die erste Verteidigungslinie des unspezifischen Immunsystems zur Abwehr mikrobieller Invasionen des Organismus.

### 3.3.2 Klassifikation

Von besonderer Bedeutung ist die Basensequenz des verwendeten CpG-ODN. Nicht nur die Basenabfolge im zentralen Hexamer, das das CpG-Motiv enthält, sondern auch die Sequenz und Länge der weiter 3'- und 5'-gelegenen Abschnitte des Nukleotids sind für die biologische Wirkung des ODN ausschlaggebend. Aufgrund verschiedener Sequenzen und daraus resultierenden unterschiedlichen Wirkungen, wurden im Laufe der letzten Jahre drei Gruppen von CpG-ODN charakterisiert, die sich jeweils durch ihre spezifische Wirkungen auf bestimmte Zellpopulationen auszeichnen.

Klasse A-CpG-ODN (Krieg/Hartmann) oder auch von Klinman als Klasse D bezeichnet, sind charakterisiert durch Poly-G-Motive (Poly-Guanosin-Motive), ein Palindrom im Zentrum und ein fenestriertes Rückgrat, das heißt in der Mitte des ODN Phosphodiester-Bindungen und an den Enden Phosphothioat-Bindungen. Sie bewirken eine starke Interferon- $\alpha$ -Produktion durch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) [KRUG et al., 2001]. Dieses führt zu einer starken sekundären Aktivierung von NK-Zellen. IFN- $\alpha$  führt weiterhin zur Antigen-unabhängigen Aktivierung von Memory-CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten [HECKELSMILLER et al., 2002],

sowie zur Ausreifung von Monozyten und Entwicklung eines DC-ähnlichen Phänotypes [GURSEL et al., 2002; KRUG et al., 2003]. Klasse A-CpG-ODN bewirken zusätzlich eine Proliferation, IFN- $\gamma$ -Produktion und eine Antigen-abhängige Aktivierung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen [ROTHENFUSSE et al., 2001]. Auf B-Lymphozyten haben sie nur schwache Effekte. Prototypen sind die in der Literatur als CpG-ODN 2216 bezeichnete Sequenz im humanen [KERKMANN et al., 2003] und CpG-ODN 1585 im murinen System [GRAMZINSKI et al., 2001].

Klasse B-CpG-ODN (Klasse K-CpG (Klinman)) besitzen weder ein Palindrom-Motiv noch Poly-G-Motive. Alle Basen sind durch Phosphothioat-Bindungen miteinander verbunden. Prototypen der Klasse B-CpG-ODN sind CpG-ODN 2006 [KERKMANN et al., 2003] und CpG-ODN 1826 [GRAMZINSKI et al., 2001]. Im Gegensatz zu Klasse A-CpG-ODN bewirken sie eine starke Aktivierung von B-Zellen, einhergehend mit einer hohen IL-6- und IgM-Produktion und einer Hochregulation Antigen-präsentierender Oberflächenproteine [HARTMANN et al., 2000], führen aber nur zu geringen IFN- $\alpha$ -Spiegeln. Sie aktivieren zytotoxische T-Lymphozyten [MICONNET et al., 2002], synergieren mit CD40-Ligand [GANTNER et al., 2003], und induzieren so eine IL-12-Sekretion durch pDC [KRUG et al., 2001], das seinerseits das Priming naiver CD4-positiver T-Lymphozyten fördert und die Entstehung einer Th1-dominierten Immunantwort bewirkt [SEDER et al., 1993; HEUFLER et al., 1996].

Die erst kürzlich beschriebenen Klasse C-CpG-ODN [HARTMANN et al., 2003; MARSHALL et al., 2003] weisen Eigenschaften der Klasse A- wie auch B-CpG-ODN auf. Sie aktivieren B-Zellen und führen zu hohen IFN- $\alpha$ -Spiegeln.

### 3.3.3 Wirkungsmechanismen

Aufgrund seiner Bedeutung für die Erkennung bakterieller DNA wie auch synthetischer CpG-ODN soll im Folgenden auf den Rezeptor für CpG-ODN, TLR9, seine Interaktion mit CpG-ODN, sowie die intrazelluläre Signalweiterleitung eingegangen werden.

TLR9 wird – im Gegensatz zu anderen TLR – nicht an der Zelloberfläche exprimiert [AHMAD-NEJAD et al., 2002], sondern wird in Membranen intrazellulärer Vesikel des endoplasmatischen Retikulums gespeichert [HEMMI et al., 2000, LEIFER et al., 2004]. TLR9 besitzt – wie auch die anderen TLR – einen extrazellulären (intra-endosomal) Anteil mit sogenannten leucine-rich repeats (LRRs), eine transmembranäre Domäne und einen zytoplasmatischen Anteil, der eine starke Homologie zu *toll* und dem Interleukin-1-Rezeptor aufweist (TIR). TLR9 wird beim Menschen von plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. In Mäusen sind zudem Makrophagen TLR9-positiv.

Aufgrund ihrer negativen Ladung können CpG-ODN (wie auch alle anderen Oligonukleotide) Zellmembranen nicht oder nur schlecht passieren, was ihre zelluläre Aufnahme drastisch einschränkt. B-Zellen weisen eine hohe Aufnahmerate auf, die vom Differenzierungsgrad der Zelle anhängig ist [ZHAO et al., 1994]. Die Aufnahme von Oligonukleotiden in pDC ist bislang nur wenig erforscht. Die aktive Aufnahme von ODN in Lymphozyten ist normalerweise sequenzunabhängig. Eine Ausnahme stellen Guanosin-reiche Oligonukleotide dar: diese werden durch den membranständigen Scavenger-Rezeptor erkannt und somit leichter als Oligonukleotide in die Zelle aufgenommen [KIMURA et al., 1994].

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist der Hauptmechanismus bei der Aufnahme von Oligonukleotiden in niedrigen Konzentrationen [YAKUBOV et al., 1989; BELTINGER et al., 1995]. Ein solcher Rezeptor könnte der Scavenger-Rezeptor Typ A (SRA) sein, der in der Lage ist, CpG-ODN zu binden [ZHU et al., 2001]. Er ist jedoch alleine nicht in der Lage, die Endozytose des gebundenen CpG-ODN zu bewirken.

Die CpG-ODN oder bakterielle DNA enthaltenden Phagosomen fusionieren mit den TLR9 enthaltenden Endosomen [TAKESHITA et al., 2001] und erlauben so den Kontakt von CpG-ODN mit TLR9. Die Absenkung des pH-Wertes innerhalb der fusionierten Vesikel ist für die Bindung bakterieller DNA beziehungsweise von CpG-ODN an TLR9 und die Signalweiterleitung ins Zellinnere unabdingbar [HU et al., 2003]. Chloroquin, wie auch andere Hemmstoffe endosomaler Reifung und Azidifizierung verhindern eine „regelrechte“ Reaktion TLR9-positiver Zellen auf CpG-ODN-Applikation [MACFARLANE et al., 1997].

TLR9 besitzt selbst keinerlei katalytische Aktivität, sondern benötigt zur Signalweiterleitung die Rekrutierung von an der inneren Seite der Plasma- beziehungsweise Vesikel-Membran fixierten katalytischen Adapter-Proteinen: Tollip und MyD88 (myeloid differentiation marker 88). Über diese Adapter-Proteine bedient sich TLR9 des Interleukin-1-Signalweges. Schnittstelle mit diesem bildet ein zytoplasmatisches Protein namens Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK). IRAK aktiviert den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6), welcher den TLR9-Signalweg mit der Signalkaskade des LPS-bindenden Rezeptors (TLR4) verknüpft. Über letztlich noch nicht gänzlich geklärte Signalwege werden die Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), extrazelluläre Rezeptorkinase (ERK), p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) und der I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK) aktiviert. IKK setzt aus I $\kappa$ B den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B frei, der in den Zellkern transloziert wird und dort Transkription mit nachfolgender Translation und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine bewirkt. Die Sekretion dieser Zytokine aus TLR9-positiven Zellen bewirkt eine Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems und stößt die Immunreaktion auf das eingedrungene Pathogen an. Somit besitzen CpG-ODN auch eine indirekte Wirkung auf verschiedene Zellpopulationen. Letzt-

endlich bewirkt eine Applikation von CpG-ODN in Zellkulturen eine Aktivierung TLR9-positiver Zellen, beziehungsweise in Versuchstieren eine Aktivierung des gesamten Immunsystems, angestoßen durch die initiale Aktivierung TLR9-positiver Zellen. Diese aktivieren ihrerseits das gesamte Netzwerk des Immunsystems. Wie diese komplexen Regelmechanismen nach CpG-ODN-Applikation genau ablaufen, ist bislang nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die zu beobachtenden Effekte von CpG-ODN von mehreren Faktoren, wie beispielsweise Sequenz, Dosierung und Applikationsmodus, abhängig sind.

### 3.3.4 Immunantwort

Das angeborene, unspezifische Immunsystem besitzt die Fähigkeit, potentielle Krankheitserreger anhand mikrobieller Muster durch eine Reihe von Keimbahn-codierten Rezeptoren, so genannten „pattern recognition receptors“ (PRR) zu erkennen, und eine Immunantwort einzuleiten, zu steuern und wieder zu beenden [MEDZHITOV et al., 1997]. Zu den PRR gehören auch die Toll-like Rezeptoren (TLR). CpG-Motive in DNA-Molekülen werden als ein solches pathogenes mikrobielles Muster von Toll-like Rezeptor 9 erkannt. TLR9 wird beim Menschen lediglich auf B-Zellen und plasmazytoid dendritischen Zellen exprimiert. Nur diese beiden Zell-Arten werden von CpG-ODN direkt aktiviert [ROTHENFUSSE et al., 2002]. Auf andere Zellen des humanen Immunsystems (Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen) besitzen CpG-ODN nur indirekte Effekte, die durch die von B-Zellen und pDC sezernierten Zytokine vermittelt werden.

CpG-ODN bewirken bei B-Lymphozyten eine erhöhte Produktion und Sekretion von IL-6 und -10 [GANTNER et al., 2003], sowie nach Proliferation und Ausreifung zu Plasmazellen eine gesteigerte Freisetzung von Immunglobulinen [KRIEG et al., 1995]. B-Zellen, die mit CpG-ODN in Kontakt gekommen sind, exprimieren verstärkt MHC I und II, sowie kostimulatorische Moleküle (CD86, CD54, CD40) auf ihrer Zelloberfläche [BAUER et al., 1999; HARTMANN et al., 2000]. Yi et al. fanden in CpG-ODN-behandelten B-Zellen zudem eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose [Yi et al., 1998]. In einer Zellreihe eines B-Zell-Lymphoms konnte als Reaktion auf eine Stimulierung mit CpG-ODN auch eine gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nachgewiesen werden [CHEN et al., 2001].

Bei pDC führen CpG-ODN zu einer Reifung unreifer, sowie zu einer Aktivierung reifer dendritischer Zellen, einhergehend mit einer vermehrten Expression von Antigen-präsentierenden Oberflächenmolekülen (CD86, CD40, MHC II) [SPARWASSER et al., 1998]. pDC sezernieren zudem Zyto- und Chemokine (IL-6, -8, -12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , ICAM-1) [PENNA et al., 2001; BAUER et al., 2001], die nachfolgend T-Zellen stimulieren. Zusammen mit CD40L

bewirken CpG-ODN die Synthese von IL-12 [KRUG et al., 2001]. Diese Mediatoren lenken das Immunsystem in Richtung einer Th1-gerichteten Antwort [HARTMANN et al., 2000].

In Mäusen wird TLR9 zusätzlich zu B-Zellen und pDC auch auf Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen in hohem Ausmaß exprimiert. Dies mag zumindest teilweise die Unterschiede in der Wirkung von CpG-ODN auf das humane und murine Immunsystem erklären, und Grund für die Schwierigkeiten beim Übertragen von Erkenntnissen aus Tiermodellen auf den Menschen sein. Zusammenfassend besteht die zentrale Wirkung von CpG-ODN in einer Modulation des Immunsystems in Richtung einer Th1-orientierten Immunantwort. Auf diese Weise vermitteln CpG-ODN eine Protektion gegenüber verschiedensten Arten von Infektionen mit Bakterien, Viren und Parasiten, steigern die Anti-Tumor-Aktivität des Immunsystems und verbessern die Wirksamkeit von Impfstoffen im Sinne eines Adjuvans.

## 4 ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, mit Hilfe des etablierten Modells der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie der Rattenleber, die durch eine Endotoxin-Injektion hervorgerufenen mikrozirkulatorischen Störungen der Leber zu untersuchen. Besonders eingegangen wurde auf die Frage, ob und inwieweit eine Präkonditionierung mit immunmodulierenden CpG-Oligodeoxynukleotiden eine Reduktion der Endotoxin-vermittelten Leber-Mikrozirkulationsstörungen und des parenchymatösen Schadens bewirken kann.

Auf folgende Fragen wurde näher eingegangen:

- 1) Bewirkt eine Vorbehandlung mit CpG-ODN eine Veränderung der nutritiven Perfusion in der Endotoxin-geschädigten Leber und hat dies Auswirkungen auf die zelluläre Integrität und den Zell-Metabolismus?
- 2) Wird die intrahepatische Leukozytenakkumulation als Ausdruck der inflammatorischen Reaktion auf den Endotoxin-induzierten Parenchym- und Endothelschaden durch eine vorhergehende Immunmodulation durch CpG-ODN beeinflusst, und führt die bekannte Immunstimulation zu einer Aktivitätsänderung der organständigen Makrophagen (Kupffer-Zellen)?
- 3) Werden intrazelluläre Mechanismen angestoßen, die die möglichen Veränderungen bewirken könnten?
- 4) Lässt sich die bekannte Eigentoxizität von CpG-ODN in unserem Modell reproduzieren und wie wirkt sich diese auf die Lebermikrozirkulation aus?
- 5) Was passiert mit den intraperitoneal applizierten CpG-ODN? Werden sie in die Blutbahn aufgenommen, und binden sie möglicherweise über einen längeren Zeitraum in der Leber?

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden an männlichen, 8-12 Wochen alten Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 180-320g durchgeführt. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), und wurden paarweise in Käfigen bis zu Versuchsbeginn in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur: 22-24°C, Luftfeuchtigkeit: ~60%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten. Die Tiere hatten bis ca. 12 Stunden vor Versuchsbeginn freien Zugang zu Tiernahrung (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und bis unmittelbar vor Versuchsbeginn freien Zugang zu Trinkwasser *ad libitum*.

Die Experimente und die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien der Tierschutzgenehmigung und standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. M. Frings.

### 5.2 Modell

#### 5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

In Diäthyläther-Kurznarkose (Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland) wurden die Versuchstiere mit einer intraperitonealen Injektion Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 50mg/kg KG [SCHÄFER et al., 2003] narkotisiert. Nach Rasur von Hals und Bauchregion (Electra GH204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland) fixiert. Die Rücksteuerung einer beim Tier zu Versuchsbeginn rektal eingeführten Temperaturmesssonde erlaubte es, die Körpertemperatur der Versuchstiere während der gesamten Versuchsdauer zwischen 36 und 37°C konstant zu halten.

Zur Erleichterung der Spontanatmung wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Dazu wurde nach einem medianen Hautschnitt die prätracheale Muskulatur atraumatisch in Längs-



richtung gespalten und die freigelegte Trachea mit zwei Ligaturen angeschlungen. In der Folge wurde mit einer Mikroschere ein Ligamentum anulare ventralseitig durchtrennt und ein Polyethylen-Tubus (Fa. Portex Ltd., Hythe, Großbritannien; Innendurchmesser (ID) 1.67mm, Außendurchmesser (OD) 2.42mm) eingelegt und mit den vorgelegten Ligaturen fixiert.

Die Präparation der A. carotis communis erfolgte im linken Spatium parapharyngeum. In diesem wurde unter Schonung des N. vagus und der V. jugularis interna die A. carotis communis isoliert und zweifach angeschlungen. Proximal wurde das Gefäß mit einem atraumatischen Gefäßclip verschlossen und distal ligiert. Nach Arteriotomie wurde ein Polyethylenkatheter (Portex; PE50, ID 0.58mm, OD 0.96mm) intraluminal platziert und mit den vorgelegten Ligaturen gegen Verrutschen gesichert. Der arterielle Zugang wurde zur kontinuierlichen Messung makrohämodynamischer Parameter über einen Dreiwegehahn (Braun, Melsungen, Deutschland) an einen Druckabnehmer (Statham Typ P23 ID, Gould Inc. Oxnard, CA, USA) angeschlossen. Weiterhin wurde über den arteriellen Zugang Blut zur Durchführung von Blutgasanalysen und Blutbildmessungen abgenommen. Die Präparation der V. jugularis externa erfolgte in ähnlicher Weise in der linken Fossa supraclavicularis. Der venöse Zugang diente der kontinuierlichen Volumensubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung (4-5ml/kg KG/h) sowie der Injektion von Fluoreszenzfarbstoffen.

Nach medianer Laparotomie wurde in einem U-förmigen Schnitt die Bauchdecke mittels Thermokoagulation durchtrennt und die so entstehenden Bauchdeckenlappen mit an Magnetständern befestigten Haken kranialwärts aufgespannt. Unter Schonung der Leber wurden zu deren Mobilisierung und folgender Auslagerung die Ligamente und Peritoneal-duplikaturen zum Zwerchfell, zum Magen und zum Retroperitoneum hin durchtrennt. Zur Kanülierung des Ductus choledochus wurde dieser auf einer Strecke von ca. 4mm aus dem umliegenden Gewebe freipräpariert, angeschlungen und nach Inzision mit einem Polyethylenkatheter (PE50, ID 0.58mm, OD 0.96mm) zur kontinuierlichen Messung der gesamtheptatischen Gallesekretion kanüliert. Nach Fixierung des Katheters wurden die freiliegenden Abdominalorgane mit einer mit isotoner Kochsalzlösung angefeuchteten Kompresse und einer Sauerstoff-impermeablen Klarsichtfolie abgedeckt, um deren Austrocknen und Auskühlen zu verhindern.

## **5.2.2 Vorbehandlung und Endotoxinämie**

Am Tag 0 wurden die Versuchstiere mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion eines CpG-Motiv-haltigen Oligodeoxynukleotids, bestehend aus 20 Nukleobasen, oder einer biologisch inerten Kontrollsequenz gleicher Länge ohne CpG-Motiv (Tabelle 3, beide Sigma

Genosys, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von jeweils 10nmol, gelöst in 500µl sterilem PBS (PAA, Linz, Österreich), unter Diethyläthernarkose vorbehandelt. Sechs Tage nach dieser Vorbehandlung wurde in einer Diethyläther-Kurznarkose durch eine einmalige intraperitoneale Injektion eines *E.coli*-Lipopolysaccharids (LPS, Serotyp O128:B12; Sigma) in einer Dosierung von 5mg/kg KG eine Endotoxinämie induziert. Das Endotoxin wurde vor der Injektion in steriler 0.9%-iger NaCl-Lösung in einer Konzentration von 2mg/ml gelöst. Sechs beziehungsweise 16 Stunden nach LPS-Injektion erfolgte die chirurgische Präparation und nachfolgende intravitale Fluoreszenzmikroskopie des linken Leberlappens.

Zur Untersuchung der Eigentoxizität und zum Verbleib von CpG-ODN nach intraperitonealer Injektion wurden Ratten in zusätzlichen Experimenten mit Fluoreszein-markierten CpG-ODN (fCpG; Sigma Genosys) i.p. vorbehandelt. Die Basensequenz der fluoreszierenden CpG-ODN war identisch zu den nicht-fluoreszierenden CpG-ODN. Einen beziehungsweise sechs Tage nach Vorbehandlung wurden die Versuchstiere dem oben beschriebenen chirurgischen Procedere unterzogen und die Lebermikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

ODN	Sequenz (5' → 3')
Kontrolle	GCTTGATGACTCAGCCGGAA
CpG-ODN/ fCpG-ODN	TTCAT <u>GACGTT</u> CCTGATGCT

**Tabelle 3:** Basensequenzen der verwendeten Oligodeoxynukleotide (ODN) in 5'-3'-Richtung. CpG-ODN und fluoreszierende CpG-ODN (fCpG-ODN) enthalten das zentrale CpG-Motiv-haltige Hexamer.

## 5.3 Untersuchungsmethoden

### 5.3.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den druckstabilen Katheter in der A. carotis communis mit Hilfe eines Statham-Druckwandlers (Statham® DTX/Plus®, Ohmeda, Erlangen Deutschland) registriert und mit einem Flachbrettschreiber kontinuierlich aufgezeichnet. Die Herzfrequenz (HF) wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplituden der fortlaufenden Registrierung bei einer Schreibergeschwindigkeit von 600mm/min durch Auszählen ermittelt. Zu fixen Zeitpunkten, die an die Untersuchung der Mikrozirkulation gekoppelt waren, wurden Messwerte zu MAP und HF erhoben.

### 5.3.2 Mikrozirkulation der Leber

Als direkte Methode der Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie benutzt, mit Hilfe derer unter Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe verschiedene Parameter der Mikrozirkulation analysiert werden können.

#### 5.3.2.1 Grundlagen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IVM)

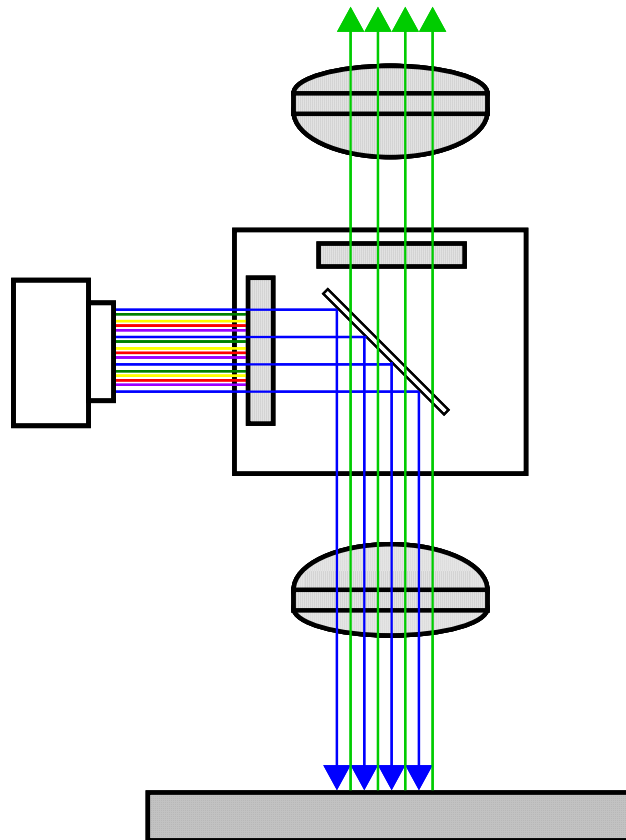
Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie nutzt die Eigenschaft fluoreszenzfähiger Stoffe, bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge ( $\lambda$ ), Lichtquanten zu emittieren. Gemäß der Definition von Fluoreszenz dauert die Leichteission genau so lange, wie anregendes Licht auf ein zur Fluoreszenz befähigtes Molekül einstrahlt.

Wird ein Körper oder Molekül mit Licht bestrahlt, so wird ihm physikalisch gesehen Energie zugeführt und von ihm absorbiert. Dabei kollidieren einfallende Photonen bei der Beleuchtung von Fluoreszenzfarbstoffen mit Elektronen des betreffenden Moleküls und übertragen ihre kinetische Energie auf dessen Elektronen. Diese Elektronen werden aus ihrem niedrigen Energieniveau auf ein energiereicheres gehoben und so aus ihrem Ruhe- oder Grundzustand per Elektronen-Schwingungsübergang in einen angeregten Singulett-Zustand überführt. Die so zugeführte Energie versetzt die jeweilige Substanz in einen energetisch höheren Zustand, wobei die zugeführte Lichtenergie in andere Energieformen (Schwingungs-, Rotations-, Anregungsenergie) umgewandelt und zwischengespeichert wird. Da der stabilste Zustand einer chemischen Verbindung aber normalerweise dem energieärmsten entspricht, versucht eine angeregte Substanz, diesen energieärmsten Zustand schnellstmöglich wieder einzunehmen, indem sie die überschüssige Energie in Form von Wärme, chemischer oder elektromagnetischer Energie (Licht) wieder abgibt. Unter Abgabe von Lichtquanten stürzen die angeregten Elektronen innerhalb von ca.  $10^{-12}$  Sekunden zurück auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Gemäß der Stokes'schen Regel, die besagt, dass ein gewisser Anteil der eingestrahlten Lichtenergie nicht als Licht zurückgestrahlt wird, sondern in einer anderen Energieform (z.B. Wärme) abgegeben wird, unterscheiden sich die emittierten Lichtquanten von den einfallenden Quanten hinsichtlich ihrer Energie, sie sind energieärmer. Entsprechend der physikalischen Formel

$$\lambda = (h \cdot c) / E$$

( $\lambda$ : Wellenlänge;  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $c$ : Lichtgeschwindigkeit;  $E$ : Energie)

ist das emittierte Licht langwelliger als das anregende Licht. Das Spektrum der emittierten Wellenlängen ist hierbei unabhängig von der Anregungswellenlänge, sondern lediglich von den Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten Moleküls. Dieser Unterschied zwischen den Wellenlängen erlaubt mit Hilfe von speziellen Filtern die Unterscheidung zwischen Anregungslicht und dem wesentlich schwächeren emittierten Licht.



**Abb. 3:** Schemazeichnung zum Aufbau einer Aufsichtfluoreszenzapparatur  
(Quelle: <http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz>)

Zur Durchführung der (intravitalen) Fluoreszenzmikroskopie in Epi-Illuminationstechnik (Aufsichtfluoreszenz-Mikroskopie) bedarf es einer speziellen Filteranordnung innerhalb des Mikroskops (Abb. 3). Der erste Filter hinter der Lichtquelle ist der so genannte Anregungsfilter, der aus dem gesamten Wellenlängen-Spektrum der Lampe denjenigen Wellenlängenbereich isoliert, der zur Anregung des entsprechenden Fluorochroms erforderlich ist. Ein nachgeschalteter dichromatischer Teilerspiegel reflektiert das Anregungslicht auf das zu mikroskopierende Objekt. Gleichzeitig muss er für das emittierte Fluoreszenzlicht möglichst vollständig durchlässig sein. Da dieser auch als Reflexions-Kurzpassfilter bezeichnete Spiegel bestimmte Bereiche eines Spektrums vollständig reflektieren und andere durchlassen kann, ist es möglich, Anregungs- und Emissionslicht exakt voneinander zu trennen. Als letztes wird mittels eines Sperrfilters aus dem verbleibenden Wellenlängenspektrum nur dasjenige herausgefiltert, das für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist.

In den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuchen wird das Fluoreszenz-Prinzip bei drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen genutzt, um die hepatische Mikrozirkulation mikroskopisch zu untersuchen: Natriumfluoreszein, ein niedermolekulares Molekül (376Da), wird von Hepatozyten aufgenommen und reichert sich in deren Zytoplasma an. Bei einer Wellenlänge von 470-490nm wird es zur Lichtemission angeregt und emittiert seinerseits Licht mit einer Wellenlänge >520nm. Rhodamin 6G dient zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten. Es hat eine Anregungswellenlänge von 530-560nm und eine Emissionswellenlänge >580nm. Bisbenzimid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Aufnahme in Hepatozyten in der DNA-Doppelhelix interkaliert und zur Darstellung des Chromatins dient. Es lässt sich mit Licht einer Wellenlänge von 330-380nm zur Photonenemission anregen und emittiert Licht einer Wellenlänge >415nm.

### **5.3.2.2 Durchführung**

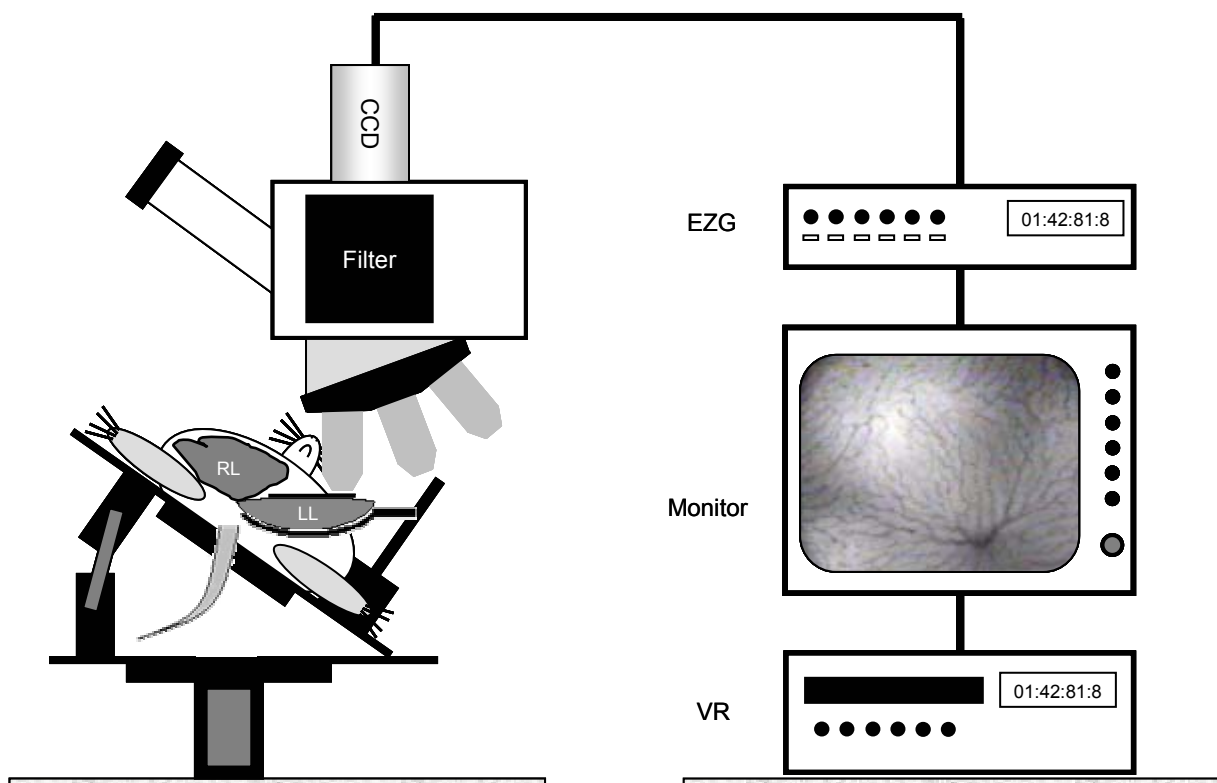
Am Tag 6 nach intraperitonealer Applikation von CpG- oder Kontroll-ODN wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie 6 oder 16 Stunden nach Endotoxin-Injektion direkt im Anschluss an die chirurgische Präparation durchgeführt. Dazu wurden die Versuchstiere auf der Heizplatte in einem Winkel von ca. 45° um die Längsachse nach links geneigt. Der von den Haltebändern befreite linke Leberlappen des Versuchstieres wurde zur Verringerung der Atemexkursionen mit Hilfe von mit physiologischer Kochsalzlösung angefeuchteten Wattetupfern auf einen in 3 Achsen frei drehbaren, mit Knetmasse ausmodellierten Löffel ausgelagert (Abb. 4). Die ausgelagerte Leber wurde mit physiologischer Kochsalzlösung superfundiert und mit einem Deckglas der Größe 24 x 24mm abgedeckt. Der Rest der Leber wurde ebenfalls mit Kochsalzlösung befeuchtet und mit einer Sauerstoff-impermeablen Klarsichtfolie gegen Austrocknung geschützt. Die auf den an einem Magnetständer fixierten Löffel ausgelagerte Leber wurde exakt horizontal, parallel zur Fokusebene unter dem Mikroskop positioniert.

### **5.3.2.3 Geräteanordnung**

Zur Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde ein modifiziertes Auflichtmikroskop (Axioplan, Zeiss, Jena, Deutschland) mit einer 100W HBO Quecksilber-Lampe (Leitz, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Das von der HBO-Lampe ausgestrahlte Licht wurde mittels eines dichromatischen Spiegels in seine Spektralfarben zerlegt durch einen nachgeschalteten Filterblock wurde Licht der Wellenlängen 470-490nm, 530-560nm oder 330-380nm herausgefiltert. Zur Verhinderung der Überstrahlung des emittierten Lichts durch das Anregungslicht wurden Sperrfilter verwendet. Die verwendeten Filter selektierten

zum einen die Wellenlängen des Anregungslichtes, als auch die des emittierten Lichtes. Ein zusätzlicher Sperrfilter verhinderte Überlagerungen durch weitere Reflexionsstahlung. Eine seitlich des Objektivs befindliche Auflicht-Hellfeld-Erregung erlaubt eine direkte Beleuchtung des Präparats. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wurde mittels einer „low light“ CCD-Kamera (FK 6990B-IQ, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego CA, USA) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen. Unter Zwischenschalten eines Echtzeitgenerators (EZG) (VTG 33, FOR-A-Company, Tokyo, Japan) zur Einblendung von Datum und Uhrzeit wurden die intravitalmikroskopischen Bilder zu einem Videorekorder (S-VHS Panasonic AG-7350, Matsushita, Tokyo, Japan) übertragen und für die spätere off-line-Auswertung auf Videobänder aufgezeichnet (Abb. 4).

Mit dem für die Aufnahmen zur quantitativen Analyse der Lebermikrozirkulation verwendeten 20x Wasser-Immersionsobjektiv (W 20x/0.5, ZEISS, Jena, Deutschland) wurde auf einem 330mm-Monitor (PVM-2130 QM, Sony, München, Deutschland) eine Gesamtvergrößerung von x465 erzielt.

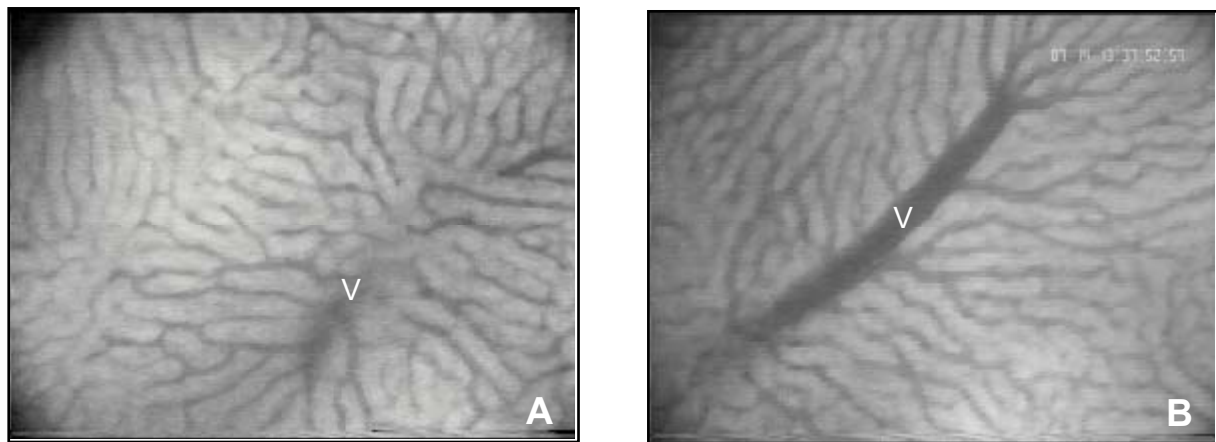


**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Aufbaus der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die Versuchsanordnung umfasst ein Mikroskop mit einer CCD-Kamera, die über einen Echtzeitgenerator (EZG) an einen Monitor und einen Videorekorder (VR) angeschlossen ist. Der linke Leberlappen (LL) wird auf einen an einem Magnetständer befestigten Löffel ausgelagert, und, mit einem Deckglas abgedeckt, horizontal unter dem Objektiv positioniert.

Zu Beginn der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, noch vor Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe, wurden zur Erfassung der parenchymatösen NADH-Autofluoreszenz bei jedem Versuchstier 6 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder bei in den Strahlengang eingebrachtem

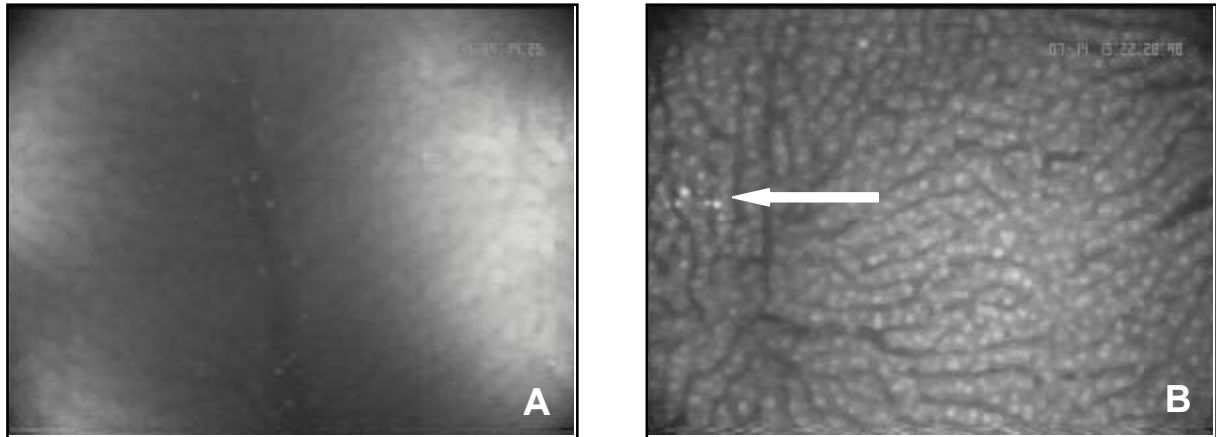
UV-Filter für je 20 Sekunden bei 10% Lichtstärke beleuchtet und auf Videoband aufgezeichnet. Während dieser Aufzeichnung war die automatische Kamerasteuerung ausgeschaltet und die Regelung für Schwarzwert und Verstärkung jeweils auf Null gestellt. Im Zeitraum dieser 20 Sekunden führte die anhaltende Beleuchtung des jeweiligen Gesichtsfeldes zum Zerfall des in Ito-Zellen gespeicherten  $\alpha$ -Retinols, und somit zu einem Ausbleichen der initial hell leuchtenden  $\alpha$ -Retinol-speichernden Ito-Zellen. Nach 20 Sekunden war nur mehr die dem Gewebe eigene NADH-Autofluoreszenz zu erkennen, die später densitometrisch gemessen wurde.

Im Anschluss daran wurden den Versuchstieren intravenös Fluoreszenzfarbstoffe injiziert: Natrium-Fluoreszein ( $2\mu\text{mol/kg KG}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur hepatozellulären Kontrastverstärkung (Abb. 5A,B), Rhodamin 6G ( $1\mu\text{mol/kg KG}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten (Abb. 6A) und Bisbenzimid ( $2\mu\text{mol/kg KG}$ ; Sigma ARK, Darmstadt, Deutschland) zur Untersuchung des apoptotischen Zelltodes (Abb. 6B). Pro Versuchstier wurden 10 Leberazini und 5 post-sinusoidale Venulen mit allen drei Filtersystemen für je 20 Sekunden mikroskopiert und die gewonnenen Bilder auf Videokassette aufgenommen.

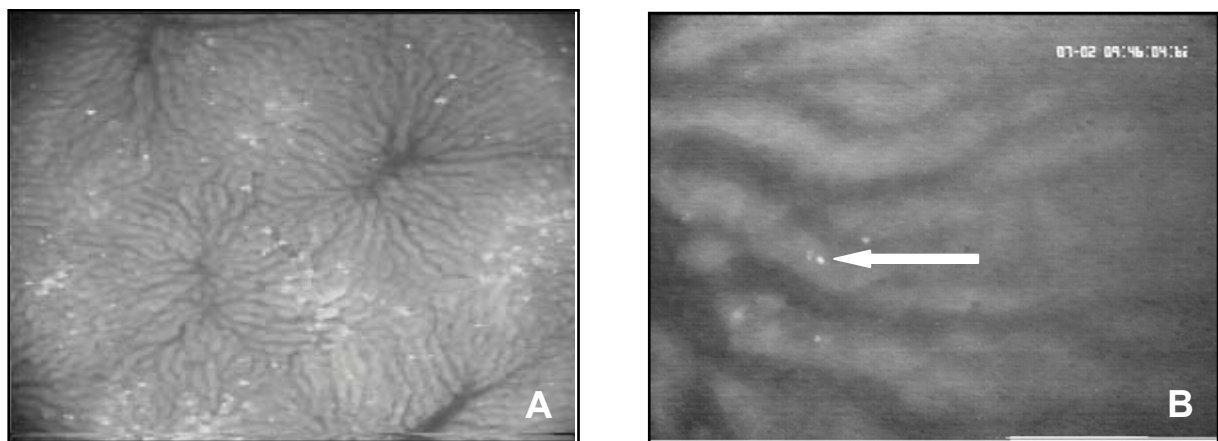


**Abb. 5A:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasser-Immersionsobjektiv ( $\times 465$ -fache Vergrößerung). Nach Natrium-Fluoreszein-Injektion zur Kontrastverstärkung stellt sich die hepatische Mikrozirkulation in Form sechseckiger Lobuli mit einer zentral gelegenen post-sinusoidalen Venule (V) dar. In **B** wird eine solche Venule im Längsschnitt dargestellt.

Bei je 4 Versuchstieren pro Gruppe wurden bei laufender Video-Aufnahme anschließend Fluoreszein-markierte Latex-beads ( $3 \times 10^8$  / kg KG,  $\varnothing 1.1\mu\text{m}$ ; Polyscience Inc., Warrington, PA, USA), gelöst in 0.1ml isotoner Kochsalzlösung, als Bolus intraarteriell injiziert. Ab dem Erscheinen des ersten Latexpartikels wurde die Zeit abgewartet, bis sich keine frei beweglichen Latex-beads mehr feststellen ließen. Während dieses Zeitraums wurden zufällig ausgewählte Leberlobuli für jeweils 10 Sekunden unter dem Blaufilter mikroskopiert und aufgezeichnet (Abb. 7A).



**Abb. 6A:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasser-Immersionsobjektiv (x465-fache Vergrößerung) nach Injektion von Rhodamin 6G. Es stellen sich gefärbte Leukozyten in einer post-sinusoidalen Venule dar. **B:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche nach Injektion von Bisbenzimid (x465-fache Vergrößerung). Man beachte die Kerne apoptotisch veränderter Hepatozyten (Pfeil).



**Abb. 7A:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 10x Wasser-Immersionsobjektiv (x234-fache Vergrößerung) nach Injektion von Fluoreszein-markierten Latex-Partikeln. Man beachte die periportal betonte Lokalisation nach Phagozytose durch Kupffer-Zellen. **B:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Ausschnittes eines Lobulus mit einem 40x Wasser-Immersionsobjektiv (x866-fache Vergrößerung) sechs Tage nach Injektion von fluoreszierenden CpG-ODN ohne Zugabe weiterer Fluoreszenzfarbstoffe. Man beachte die fluoreszierenden CpG-ODN (Pfeil) in Sinusuferzellen.

Die Tiere, denen fluoreszierende CpG-ODN injiziert worden waren, wurden einer identischen Mikroskopie unterzogen, allerdings wurde vor Injektion der Farbstoffe die Leberoberfläche im Blaufilter mit einem 40xObjektiv (W 40x/0.75, ZEISS, Jena, Deutschland) mikroskopiert, um intrahepatisch gebundene fluoreszierende CpG-ODN zu suchen (Abb. 7B).



### 5.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Die während der einzelnen Versuche aufgezeichneten Videoaufnahmen wurden nachfolgend computerunterstützt mit Hilfe der Software CapImage® 5.03 (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Zur Abgrenzung der zu analysierenden Leberlobuli dienten optimierte Schablonen, die der Form einzelner Lobuli entsprachen. Somit wurden nur die innerhalb dieser Schablonen stattfindenden mikrozirkulatorischen Parameter analysiert. Hierbei wurden folgende Parameter untersucht:

#### 5.3.3.1 *sinusoidale Perfusion und Gewebeoxygenierung*

Die Aufnahmen, die zu Beginn eines jeden Versuchs noch vor Injektion der Farbstoffe gemacht wurden, dienten der Messung der NADH-Autofluoreszenz des Leberparenchyms. Dazu wurde exakt 20 Sekunden nach dem ersten Beleuchten des Gesichtsfeldes an jeweils sechs verschiedenen Stellen im midzonalen Bereich eines Lobulus die Grauwertdichte als Ausdruck der Autofluoreszenz densitometrisch gemessen und in arbiträren Einheiten (aE) wiedergegeben.

Zur Analyse von Perfusionsausfällen innerhalb hepatischer Lobuli dienten die Aufnahmen, die mit dem Blaufiltersystem gemacht wurden. Dazu wurden alle Sinusoide im midzonalen Bereich der Schablone gezählt und die Zahl der nicht-perfundierten Sinusoide in Prozent zur Gesamtzahl aller Sinusoide innerhalb der Schablone angegeben.

#### 5.3.3.2 *venuläre Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit*

Weiterhin dienten diese Aufnahmen der Bestimmung des Durchmessers post-sinusoidaler Venulen zur Berechnung der Endotheloberfläche. Als Grundlage dafür wurde eine Strecke  $l$  von 100  $\mu\text{m}$  eines Gefäßabschnittes gewählt und innerhalb dieser Strecke an verschiedenen Punkten der Durchmesser  $d$  [ $\mu\text{m}$ ] des Gefäßes bestimmt. Unter der Annahme, dass in diesem Bereich die Venule eine zylindrische Geometrie aufweist, wurde die Mantelfläche  $A$  dieses Zylinders nach der Formel

$$A = d * \pi * l / 10^6 \text{ [mm}^2\text{]}$$

errechnet.

In diesen post-sinusoidalen Venulen wurde ebenfalls die Erythrozytenfließgeschwindigkeit  $V_{\text{Ery}}$  gemessen. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe der Caplimage®-Software in die Mitte der betrachteten Venule eine virtuelle Linie gelegt, entlang derer die Erythrozytenfließgeschwindigkeit von der Caplimage®-Software gemessen wurde. Aus dem Verhältnis der Länge der Gefäßabschnitts  $s$  [ $\mu\text{m}$ ] und der dafür benötigten Zeit  $t$  [s] errechnet sich die Erythrozytenfließgeschwindigkeit [ $\mu\text{m/s}$ ] gemäß der Formel

$$V_{\text{Ery}} = s / t \text{ } [\mu\text{m/s}]$$

#### **5.3.3.3 Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen**

In jeder Gruppe wurden 4 Versuchstieren bei laufender Video-Aufzeichnung  $3 \times 10^8$  / kg KG Latex beads intraarteriell injiziert. Zur Untersuchung der Kupffer-Zell-Aktivität, das heißt der Kinetik der Adhäsion und Phagozytose der Latex-Partikel, wurden bei jedem Versuchstier über einen Zeitraum von 5 Minuten ab dem Zeitpunkt der Injektion im Abstand von jeweils 10 Sekunden sukzessive zufällig ausgewählte Gesichtsfelder im Blaufilter mikroskopiert und auf Videoband aufgezeichnet. Je nach Bedarf wurde zur Kontrastverbesserung vorher  $1 \mu\text{mol/kg}$  Natrium-Fluoreszein injiziert. Die Phagozytose-Kinetik wurde quantifiziert, indem die Anzahl der in Sinusoiden frei fließenden Latex-Partikel als prozentualer Anteil aller im Lobulus sichtbaren Latex-Partikel während des Beobachtungszeitraums von 10 Sekunden angegeben wurde. Da die Gesamtzahl der Partikel innerhalb der Gesichtsfelder in Abhängigkeit der Perfusion variierte, wurden diese Daten normalisiert und als prozentualer Anteil aller pro Gesichtsfeld sichtbarer Latex-Partikel ausgedrückt.

#### **5.3.3.4 hepatozelluläre Apoptose**

Die Aufnahmen, die mit dem UV-Filtersystem gemacht wurden, zeigten die mit Bisbenzimid angefärbten Kerne der Hepatozyten. Anhand der Leuchtintensität der gefärbten Kerne wurde die Anzahl der Kerne, die morphologische Korrelate der Apoptose wie Kondensation, Margination, Fragmentation oder auch so genannte „apoptotic bodies“ zeigten, zonal separat bestimmt.

#### **5.3.3.5 mikrovaskuläre Leukozyten-Retention**

Die mit dem Grünfilter-System erstellten Aufnahmen zeigten die mit Rhodamin 6G *in vivo*-gefärbten Leukozyten. Somit konnten die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen im Sinne adhärenter Leukozyten analysiert werden. In den Sinusoiden wurde die Zahl der Leukozy-

ten, die über einen Zeitraum von mehr als 20 Sekunden stagnierten, nach zonaler Gliederung bestimmt. In den post-sinusoidalen Venulen wurde ebenfalls die Zahl der für 20 Sekunden adhärenenten Leukozyten in einem Abschnitt von 100µm analysiert. Zusammen mit der in der Natrium-Fluoreszeinfärbung ermittelten Gefäßoberfläche wurde dann die Zahl adhären-ter Leukozyten pro mm<sup>2</sup> Gefäßoberfläche errechnet.

#### **5.3.4 hepatozelluläre Exkretionsfunktion**

Zur Beurteilung der hepatozellulären Exkretionsfunktion wurde die Gallesekretion, beginnend ab der Punktion des Ductus choledochus, jeweils in 20-Minuten-Intervallen gemessen. Hierzu wurde die sezernierte Galle in vor Versuchsbeginn abgewogenen Insulinspritzen aufgefangen und deren Gewicht mit einer Präzisionswaage (AP 110, Analytical plus, Ohaus, Deutschland) zur Berechnung der gesamtheptatischen Galleproduktion  $\beta$  bestimmt. Diese ergibt sich als Quotient des Volumens der sezernierten Galle  $V_G$  [µl] und dem Produkt aus Leberfeuchtgewicht  $G_L$  [g] und Zeitintervall, in dem die Messung erfolgte [min]:

$$\beta = V_G / G_L \times t \text{ [µl / g * min]}$$

Das Volumen der produzierten Galle  $V_G$  ergibt sich aus dem Quotienten aus Gewicht der produzierten Galle  $G_G$  [g] und der Dichte  $\rho$  der Galle, für die ein Wert von 1g/ml [SUMI-MOTO et al., 1988] angenommen wurde:

$$V_G = G_G / \rho \text{ [µl]}.$$

#### **5.3.5 Probenentnahme**

##### **5.3.5.1 Blutentnahme**

Am Ende jedes Versuches wurde den Versuchstieren über den arteriellen Katheter Vollblut in heparinisierte Kapillaren zur Durchführung einer Blutgasanalyse entnommen. Des Weiteren wurden ca. 2ml Vollblut in Ca<sup>2+</sup>-EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Dieses diente zur Erstellung eines Blutbildes, sowie zur Gewinnung von Plasma durch Zentrifugation.

##### **5.3.3.2 Gewebeasservierung**

Nach der Blutentnahme wurde den Versuchstieren die Leber zu histologischen und

proteinbiochemischen Untersuchungen entnommen und die Tiere gleichzeitig mit einer Pentobarbital-Überdosierung getötet.

Die entnommene Leber wurde zur Bestimmung des Leber-Feuchtgewichts gewogen, in kleine Stücke geschnitten und anschließend für proteinbiochemische Untersuchungen in sterilem PBS gewaschen und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Ein weiterer Teil der entnommenen Leber wurde in TissueTek (Jung Einbettmedium, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet und zur immunhistologischen Untersuchung ebenfalls in Flüssigstickstoff eingefroren. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Durchführung der entsprechenden Untersuchungen bei -80°C gelagert. Der Rest der Leber wurde in 4%-igem Phosphat-gepuffertem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für etwa 3-4 Tage fixiert und anschließend zur histologischen Untersuchung in Paraffinwachs eingebettet.

### **5.3.6 Vollblut-Untersuchungen**

#### **5.3.6.1 Enzym-Bestimmung im Plasma**

Aus dem bei Versuchsende in EDTA-beschichtete Röhrchen entnommenen Vollblut wurde durch dreiminütige Zentrifugation mit 3000 Umdrehungen / Minute Blutplasma gewonnen. Dieses wurde mit einer Mikropipette vorsichtig isoliert und bis zur Durchführung der laborchemischen Untersuchungen bei -20°C gelagert.

Die Aktivitäten der Enzyme Aspartat-Amino-Transferase (AST, =GOT) und Alanin-Amino-Transferase (ALT, =GPT) sind bei Schädigung der hepatozellulären Plasmamembran als Ausdruck des Leberschadens erhöht. Zur Untersuchung der hepatozellulären Integrität wurden spektrophotometrisch [BERGMEYER et al., 1978] die Aktivitäten der Transaminasen (AST, ALT) im Plasma bestimmt. Des Weiteren wurden die Plasmaaktivitäten der Glutamat-dehydrogenase (GLDH) und der Cholinesterase (ChE) analysiert, um Aussagen über die Schwere des Leberschadens sowie der Störungen der Sekretionsleistung der Leber zu erhalten.

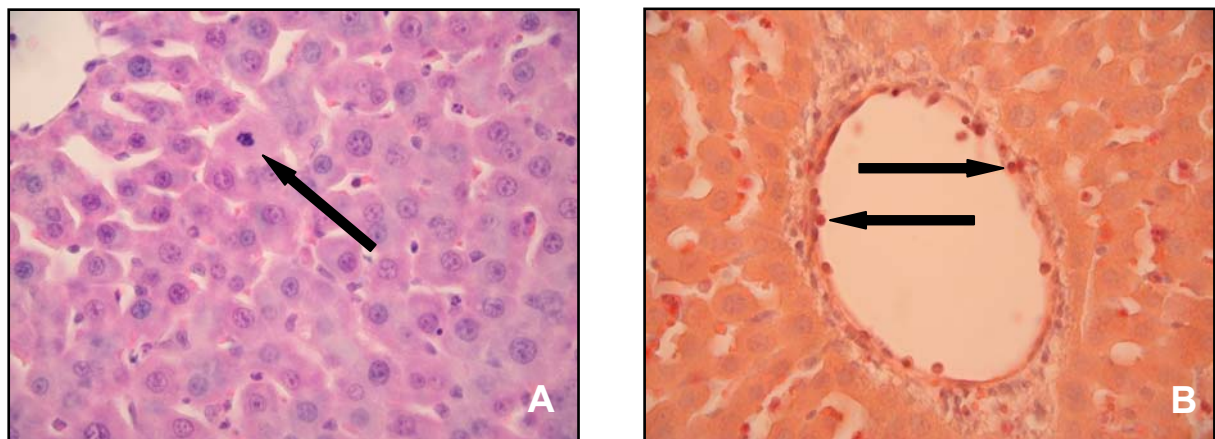
#### **5.3.6.2 Blutgasanalyse, Blutbild**

Die Analyse des während des Versuchsablaufs und zum Versuchsende entnommenen Bluts hinsichtlich arterieller Blutgase, pH-Wert und Hämatokrit-Wert erfolgte unter Zuhilfenahme eines CHIRON-Diagnostics. Mit Hilfe eines Coulter Counters (Coulter AcT diff, Hialeah, FL, USA) wurden die systemische Leukozytenzahl und das Differentialblutbild bestimmt.

### 5.3.7 Histologische Analysen - Standardfärbungen

Aus den asservierten Gewebeproben wurden aus den Kontrollgruppen jeweils 7 und aus den CpG-ODN-Gruppen jeweils 8 Proben pro Gruppe zufällig ausgewählt. Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom in Schnitte mit 5µm Dicke geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE; Abb. 8A) und zum Nachweis infiltrierender Neutrophiler mit AS-D Chlor-Acetatesterase (CAE; Abb. 8B) gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Die Auswertung der HE gefärbten Leberhistologien erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc). An verblindeten Schnitten wurde der aus der Endotoxinämie resultierende Parenchymschaden untersucht, der anhand der hepatozellulären Apoptose quantifiziert wurde. Dazu wurden pro Gewebeschnitt jeweils 10 Gesichtsfelder (high power fields HPF, x40 Objektiv) bei 400-facher Vergrößerung analysiert. In jedem der Gesichtsfelder wurde nach Bestimmung der Gesamtzahl sämtlicher Hepatozyten die Anzahl an parenchymatösen Zellen erfasst, deren Zellkern für apoptotische Vorgänge charakteristische morphologische Veränderungen aufwies. Als morphologische Kriterien dienten hierbei Veränderungen wie Kondensierung des Chromatins, Zell- und Kernschrumpfung, Karyopyknose, Karyorhexis und so genannte „apoptotic bodies“. Die Anzahl der derart veränderten Hepatozyten wurde als Anzahl apoptotischer HE-patozyten pro Gesichtsfeld wiedergegeben.



**Abb. 8A:** HE-Histologie einer Kontroll-Leber 6 Tage nach Kontroll-ODN und 6h nach LPS-Injektion. Man beachte einzelne hepatozelluläre Apoptosen (Pfeil). Vergrößerung x400. **B:** CAE-Färbung einer Kontroll-Leber 6 Tage nach Kontroll-ODN und 6h nach LPS-Injektion. Man beachte die ausgeprägte Adhärenz der Leukozyten am venulären Endothel sowie in den peri-venulären Raum extravasierte Leukozyten (Pfeile). Vergrößerung x400.

Anhand der CAE-gefärbten Schnitte wurde die intrahepatische Leukozytenretention in Sinusoiden untersucht. Hierzu wurde nach Verblindung in jeweils 10 Gesichtsfeldern pro

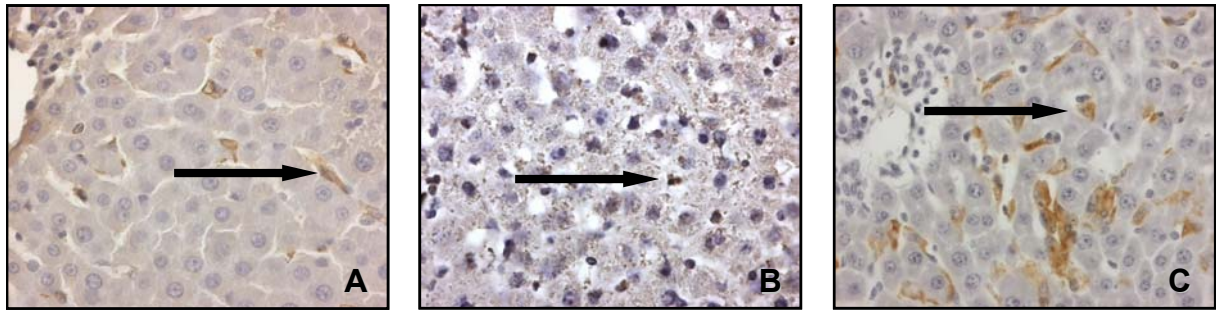
Gewebeschnitt bei 400-facher Vergrößerung, die Zahl der in Sinusoiden adhärenenten Leukozyten erfasst, sowie die Anzahl der in den perivasalen Raum post-sinusoidaler Venulen extravasierten Leukozyten gezählt (Abb. 8B).

### **5.3.8 Proteinbiochemische Analysen**

#### **5.3.8.1 Immunhistochemie**

Die in Paraffinwachs gebetteten Gewebeschnitte wurden im Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100–70% Ethanol) bewässert. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Häm-Oxygenase-1 (HO-1, Abb. 9A) durchgeführt. Dabei wurde als Primärantikörper ein rabbit-anti-rat-HO-1-Antikörper (Stressgen Biotechnol Corp, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein goat-anti-rabbit-Antikörper (Amersham, Freiburg, Deutschland; 1:100). Zur immunhistochemischen Darstellung von TLR4 (Abb. 9B) und ED2 (Abb. 9C) wurden aus den nach Versuchsende asservierten und mit Gewebemedium eingefrorenen Gewebeproben 5µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und direkt nach dem Schneiden bei 4°C in Aceton fixiert. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte zuerst mit den Primärantikörpern (TLR4: goat-anti-rat-TLR4 (SantaCruz, Heidelberg, Deutschland; 1:50), ED2: mouse-anti-rat-ED2 (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln Deutschland; 1:100)), und dann mit dem entsprechenden Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (rabbit-anti-goat bzw. goat-anti-mouse (1:100)) inkubiert. Alle Schnitte wurden anschließend mit aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid inkubiert. Nach Färbung mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt.

Mit einem Olympus BX60 Lichtmikroskop wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt jeweils 2 Schnitte von zufällig ausgewählten Kontroll-Tieren und jeweils 3 Schnitte von CpG-ODN-vorbehandelten Tieren analysiert. Dabei wurden 25 Gesichtsfelder bei einer 400-fachen Vergrößerung analysiert. Es wurden alle HO-1-, sowie alle ED2-positiven Zellen in jedem Gesichtsfeld gezählt. Die TLR4-gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines Scores semiquantitativ hinsichtlich der Stärke der TLR4-Expression bewertet (0: keine Expression, 1: mäßige Expression, 2: starke Expression).



**Abb. 9A:** HO-1-Immunhistochemie einer Kontroll-Leber 6 Tage nach Kontroll ODN und 6h nach LPS-Injektion. Man beachte die Expression von HO-1 in Kupfer- und Endothelzellen (Pfeil). Vergrößerung x400. **B:** TLR4-Immunhistochemie einer Kontroll-Leber 6 Tage nach Kontroll ODN und 6h nach LPS-Injektion. Man beachte die TLR4-Expression in Hepatozyten und Kupfer-Zellen (Pfeil). Vergrößerung x400. **C:** ED2-Immunhistochemie einer Kontroll-Leber 6 Tage nach Kontroll ODN und 6h nach LPS-Injektion. Man beachte die Expression von ED2 auf Kupfer-Zellen (Pfeile). Vergrößerung x400.

### 5.3.8.2 Western Blot

Von den kryokonservierten Leberproben wurden 100 bis 200mg Gewebe mit einem Low Salt-Lysepuffer, bestehend aus 10mM TRIS, pH 7.5, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.5% Triton X 100, 0.02% NaN<sub>3</sub>, unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Cocktails (1:50; Sigma) und PSMF (1:100; Roth) mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 30min auf Eis inkubiert und dann 30min bei 4°C mit 16.000g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) und der Überstand als Gesamtzell-Extrakt abpipettiert. Die so gewonnenen Aliquots wurden auf Eis gelagert und sofort zur Proteinbestimmung verwendet. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde spektrophotometrisch mit der Methode nach Lowry bestimmt und durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf den gleichen Proteingehalt eingestellt. Die eingestellten Extrakte wurden nach Zusatz von 2x 'Sample buffer' nach Lämmli (Sigma) 5min im kochenden Wasserbad denaturiert, und anschließend in einer Konzentration von 60µg/Bande in die Geltaschen transferiert.

Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%) elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100V im Sammelgel (15min) und von 140V im Trenngel (1h) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Molekulargewichts-Standard diente der Rainbow high range Marker (Amersham). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpuffer-Bad für das anschließende Membran-Blotting equilibriert. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend während einer Dauer von 2 Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) bei einer angelegten Spannung von 50V auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0.2µm, BioRad) transferiert.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen mit einer 5%-igen

Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk, BioRad) in TBS-T für 30min inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T wurden die Primär-Antikörper für 120min bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 4).

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden POD-markierten Sekundärantikörper (Tabelle 4) für 90min. Im Anschluss wurden die Membranen fünfmal mit TBS-T gewaschen und nachfolgend der Chemilumineszenz-Methode (ECL, Amersham) unterzogen. Dazu wurden die Membranen nach einminütiger Inkubation mit dem ECL-Reagenz in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham pharmacia biotech) in einer Röntgenkassette positioniert. Die Signale der belichteten Filme wurden anschließend in Entwicklungs- und Fixierbädern (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, Deutschland) visualisiert und konserviert.

Zur Kontrolle der Protein-Beladung und des -Transfers wurde ein monoklonaler  $\beta$ -Aktin-Antikörper als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte Dichte rechnerisch auf gleiche  $\beta$ -Aktin-Konzentrationen korrigiert. Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und einem Quantifizierungsprogramm (Quantity One – Geldoc, BioRad).

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
$\beta$ -Aktin	mouse	1:5000	Sigma	sheep-anti-mouse	1:5000	Amersham
TLR4	goat	1:200	Santa Cruz	rabbit-anti-goat	1:2000	R&D
TRAF6	rabbit	1:200	Santa Cruz	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham
NF $\kappa$ B	mouse	1:250	Chemicon	sheep-anti-mouse	1:5000	Amersham
Caspase 3	rabbit	1:800	Cell Signaling	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham
iNOS	rabbit	1:500	Bio Mol	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham
HO-1	rabbit	1:250	Stresgen	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham

**Tabelle 4:** Auflistung der für Western Blot-Analysen eingesetzten Antikörper



## 5.4 experimentelles Protokoll

Ziel der Untersuchung war es zu klären, inwieweit die durch LPS induzierte Schädigung der hepatischen Mikrozirkulation durch Präkonditionierung mit CpG-ODN vermindert werden kann.

Hierzu erfolgten bei 28 Tieren 6 Tage nach Vorbehandlung mit einer biologisch inerten DNA-Sequenz ohne CpG-Motiv (Kontroll-Gruppe) und bei 25 Tieren 6 Tage nach Vorbehandlung mit einer CpG-Motiv-haltigen DNA-Sequenz Anästhesie und chirurgische Präparation, wie unter 5.2.1 beschrieben. Jeweils 14 Tiere der Kontrollgruppe wurden 6 beziehungsweise 16 Stunden vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mit einer einmaligen Injektion Lipopolysaccharid in einer Dosierung von 5mg/kg KG vorbehandelt worden. Aus der CpG-ODN-Gruppe wurden 12 Tiere 6 Stunden und 13 Tiere 16 Stunden vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mit Endotoxin in gleicher Dosierung vorbehandelt.

Nach der Präparation erfolgten die basale Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz, sowie eine Blutgasanalyse und eine Blutbilduntersuchung.

An die Messung der Basalwerte schloss sich eine intravitalmikroskopische Untersuchung der Lebermikrozirkulation an, im Rahmen derer folgende Parameter untersucht wurden:

- 1) *NADH-Autofluoreszenz*
- 2) *nicht-perfundierte Sinusoide*
- 3) *hepatozelluläre Apoptose*
- 4) *intrahepatische Leukozytenakkumulation*
- 5) *venöse Blutflussgeschwindigkeit*
- 6) *Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität*

Während der Mikroskopie wurden kontinuierlich die Gallesekretion gemessen und MAP und HF abgeleitet. Nach Beendigung der Mikroskopie erfolgte eine zweite Messung von Blutgasen, Differentialblutbild, sowie eine abschließende Messung von MAP und HF. Zur Bestimmung leberspezifischer Enzyme wurde Vollblut in EDTA-beschichtete Röhrchen abgenommen, die Leber wurde zur Bestimmung des Feuchtgewichts entnommen, gewogen und anschließend für histologische und proteinbiochemische Untersuchungen asserviert.

## 5.5 Statistik

Die während der primären Datenerfassung erhobenen Daten wurden bei der Auswertung der Videobänder, der histologischen Schnitte und proteinbiochemischen Untersuchungen zur elektronischen Datenverarbeitung direkt in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) eingegeben.

Die so erhobenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen als absolute oder prozentuale Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ( $MW \pm SEM$ ) dargestellt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) unter Verwendung der SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

Zum Vergleich zwischen Kontroll- und CpG-ODN-Gruppe wurde ein Student's *t*-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diesen nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test für unverbundene Stichproben (Mann Whitney-Test) durchgeführt.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus getroffen.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Makro- und Mikrozirkulation der Leber

#### 6.1.1 systemische Parameter

##### 6.1.1.1 *Blutdruck und Herzfrequenz*

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) war 6 Stunden nach Endotoxin-Injektion bei Kontroll-Tieren höher als bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren. Im Gegensatz dazu war er nach 16-Stunden Endotoxinämie bei Kontrolltieren im Vergleich zu den Tieren der CpG-ODN-Gruppe deutlich reduziert (Tabelle 5). Die Herzfrequenz (HF) war nach 6- wie nach 16-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der Kontroll-Gruppe im Vergleich zu CpG-ODN-vorbehandelten Tieren nicht verändert (Tabelle 5).

##### 6.1.1.2 *Hämatokrit und pH-Wert*

Die Untersuchung des Hämatokrit-Wertes zu Beginn der Versuche ergab nach 6-stündiger Endotoxinämie einen etwas geringeren Hämatokrit-Wert bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 5). Nach 16 Stunden Endotoxinämie boten CpG-ODN-vorbehandelte Tiere einen jedoch deutlich höheren Hämatokrit-Wert als Tiere der Kontrollgruppe. Diese Verhältnisse blieben während der Versuchsdauer konstant, und konnten durch die Messung zu Versuchsende bestätigt werden.

Der pH-Wert war nach 6-stündiger Endotoxinämie bei Kontrolltieren im Vergleich zu CpG-ODN-behandelten Tieren nicht-signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu war nach 16 Stunden Endotoxinämie der pH-Wert im arteriellen Blut von Kontrolltieren nicht-signifikant niedriger als bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe (Tabelle 5).

##### 6.1.1.3 *Blutgasanalyse*

Nach 6-stündiger Endotoxinämie zeigten die Tiere der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits einen leicht erhöhten Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut

(Tabelle 5). Nach 16-stündiger Endotoxinämie wiesen die Tiere eine insgesamt verbesserte Oxygenierung als nach 6 Stunden auf, wobei die CpG-ODN-vorbehandelten Tiere wiederum einen höheren Sauerstoffpartialdruck zeigten als die Kontrolltiere. Der arterielle CO<sub>2</sub>-Partialdruck (pCO<sub>2</sub>) lag bei den Tieren aller vier Versuchsgruppen im Mittel zwischen 42 und 44mmHg, wobei CpG-ODN-vorbehandelte Tiere zu beiden Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zu den Kontrolltieren etwas höhere pCO<sub>2</sub>-Werte aufwiesen (Tabelle 5).

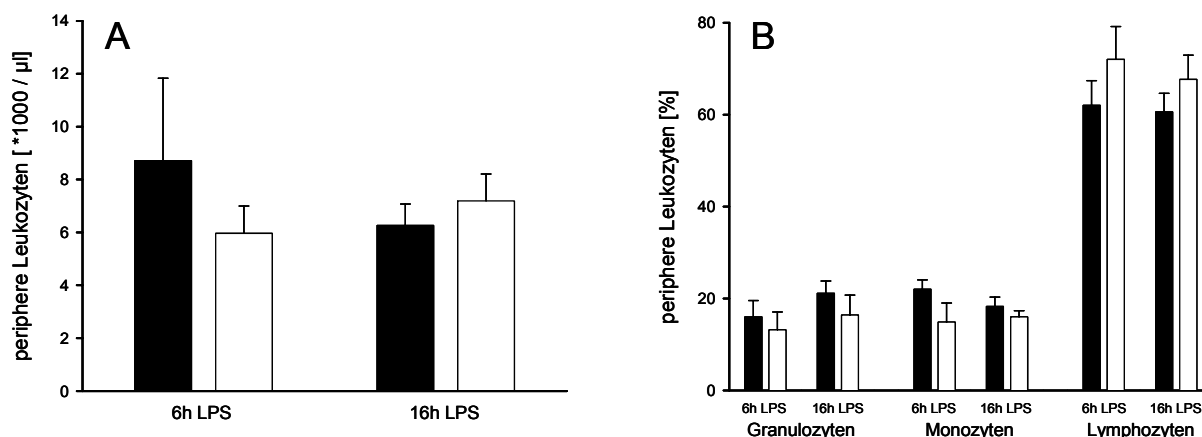
	6h LPS			16h LPS		
	Kontrolle	CpG-ODN	p	Kontrolle	CpG-ODN	p
<b>MAP</b> [mmHg]	104±4	96±6	0.251	93±8	108±4	0.134
<b>HF</b> [min <sup>-1</sup> ]	351±18	348±12	0.886	334±22	329±23	0.881
<b>Hämatokrit</b> [%]	36±1	33±2	0.979	35±1	39±2	0.079
<b>pH-Wert</b>	7.35±0.02	7.34±0.02	0.627	7.30±0.03	7.31±0.03	0.797
<b>pO<sub>2</sub></b> [mmHg]	107±3	109±7	0.848	115±4	119±7	0.574
<b>pCO<sub>2</sub></b> [mmHg]	42±2	44±3	0.486	43±3	44±5	0.857

**Tabelle 5:** Systemische Parameter im Vergleich zwischen Kontroll- und CpG-ODN-vorbehandelten Tieren jeweils 6 oder 16 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion. MW ± SEM.

#### 6.1.1.4 Differentialblutbild

Die Analyse der Anzahl peripherer Leukozyten zeigte, dass nach 6-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe weniger Leukozyten im peripheren Blut zirkulierten als bei Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 10A). Im Gegensatz dazu zeigten CpG-ODN-vorbehandelte Tiere nach 16 Stunden Endotoxinämie gegenüber Kontrolltieren eine leicht erhöhte Anzahl peripherer Leukozyten. Insgesamt zeigten Tiere der Kontrollgruppe nach 16-stündiger Endotoxinämie im Vergleich zum Zeitpunkt 6h eine deutliche Abnahme der peripheren Leukozytenzahlen, während die Leukozytenzahlen bei Tieren der CpG-ODN-Gruppen nahezu unverändert waren (Abb. 10A).

Die Auswertung des Differentialblutbildes ergab nach 6- wie nach 16-stündiger Endotoxinämie einen leichten Rückgang des prozentualen Anteils der Monozyten und Granulozyten bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen. Hingegen führte eine Vorbehandlung mit CpG-ODN nach 6- wie nach 16-stündiger Endotoxinämie zu einem Anstieg des Lymphozyten-Anteils im peripheren Blut (Abb. 10B).

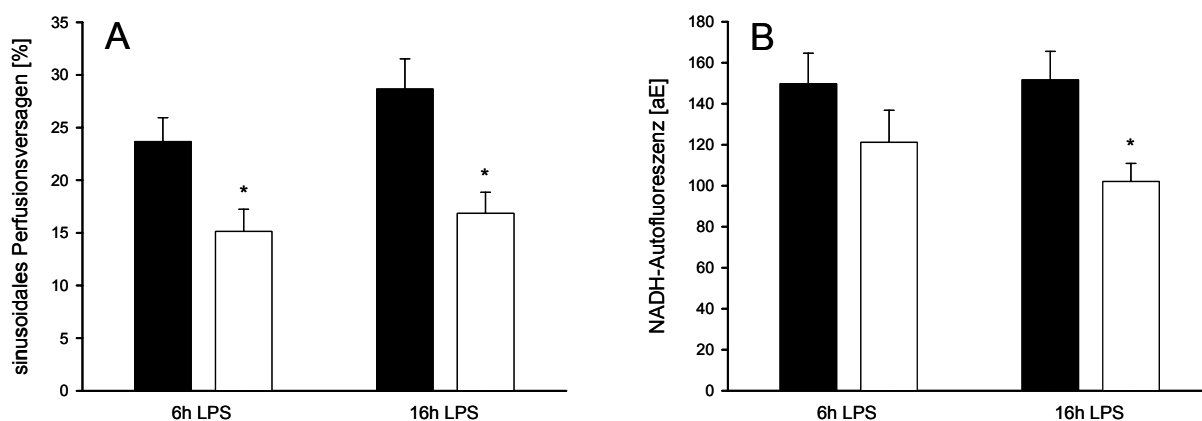


**Abb. 10:** periphere Leukozytenzahl (A) und Differentialblutbild (B) nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=12$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=14$ ). MW  $\pm$  SEM.

## 6.1.2 intravitale Fluoreszenzmikroskopie

### 6.1.2.1 mikrozirkulatorisches Perfusionsversagen und Gewebeoxygenierung

Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Natrium-Fluoreszein konnte mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die Perfusion der Kapillaren in den einzelnen Lobuli untersucht werden.



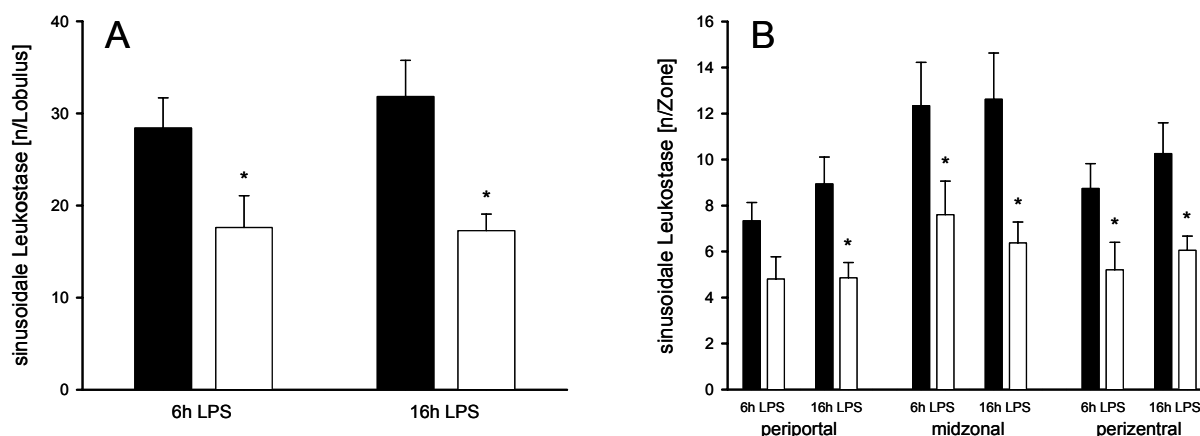
**Abb. 11:** sinusoidales Perfusionsversagen (A) und parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz (B) nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=12$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=14$ ). MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Die Vorbehandlung mit CpG-ODN führte 6 wie 16 Stunden nach LPS-Injektion zu einer signifikanten Reduktion der sinusoidalen Perfusionsausfälle. Bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie konnten, ausgehend von  $23.7 \pm 2.3\%$  bei Tieren der Kontrollgruppe, bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe lediglich  $15.1 \pm 2.1\%$  nicht-perfundierte Sinusoide beobachtet werden. Nach 16-stündiger Endotoxinämie war die nutritive Perfusion bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe noch deutlicher verbessert (Abb. 11A).

Auf der Grundlage, dass die zelluläre Sauerstoffversorgung als Resultante der nutritiven Perfusion negativ mit dem zellulären NADH-Gehalt korreliert, wurde die parenchymatöse NADH-Autofluoreszenz zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen noch vor Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe im UV-Filter untersucht. In unserem Modell war bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie eine deutliche Reduktion der NADH-Autofluoreszenz bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe zu verzeichnen. Nach 16 Stunden war diese Reduktion in der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 11B).

### 6.1.2.2 intrahepatische Leukozytenretention

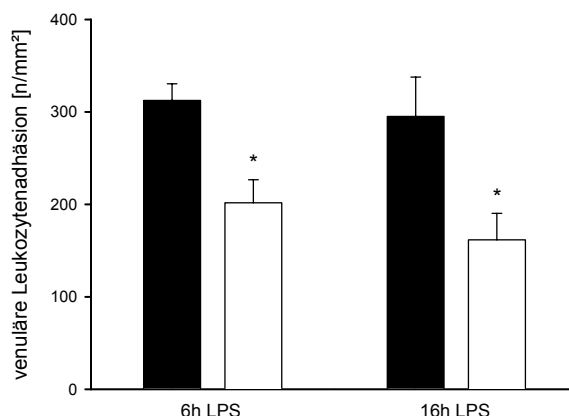
Mittels i.v.-Applikation von Rhodamin 6G zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in hepatischen Sinusoiden untersucht. Gezählt wurden alle diejenigen Leukozyten, die sich während eines Beobachtungszeitraumes von 20s nicht bewegten; solche wurden als fest adhärent definiert. Bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie war bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Leukozyten-Stase in Sinusoiden zu beobachten. Diese signifikante Verminderung konnte auch 16 Stunden nach Endotoxin-Injektion in der CpG-ODN-Gruppe festgestellt werden (Abb. 12A). Die zonale Untersuchung der Leukozyten-Stase zeigte nach CpG-ODN-Präkonditionierung in allen Zonen 6 wie 16 Stunden nach Endotoxin-Injektion eine deutliche beziehungsweise signifikante Reduktion der Leukozyten-Stase (Abb. 12B).



**Abb. 12:** sinusoidale Leukozyten-Stase (A) und deren zonale Verteilung (B) nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=12$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=14$ ). MW  $\pm$  SEM, \*  $p<0.05$  vs. Kontrolle.

Die Analyse der Leukozytenadhärenz in post-sinusoidalen Venulen zeigte bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese signifikante Reduktion fand sich auch nach 16-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe (Abb. 13). Beim Vergleich der CpG-ODN-

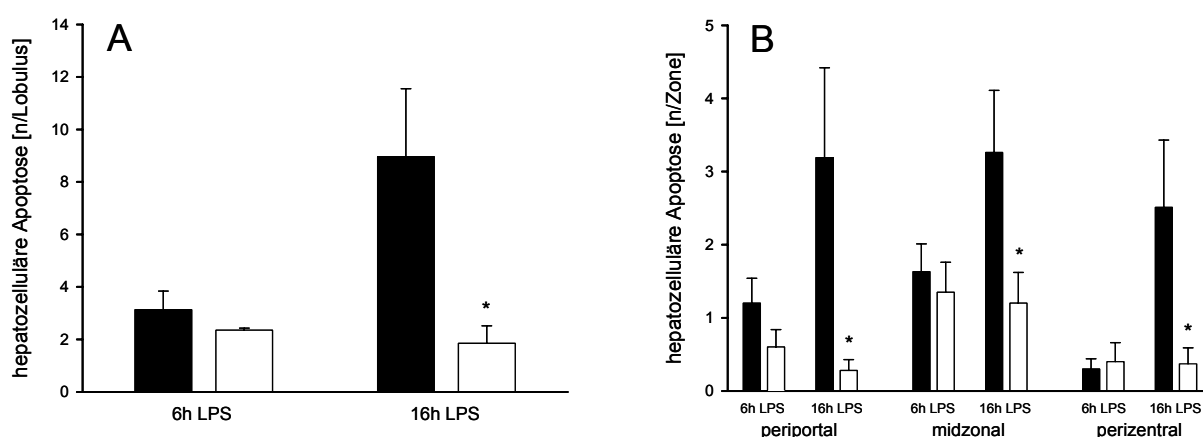
vorbehandelten Gruppen zeigte sich nach 16-stündiger Endotoxinämie im Vergleich zur 6-Stunden-Gruppe eine um 20% reduzierte venuläre Leukozytenadhärenz.



**Abb. 13:** Leukozytenadhäsion in post-sinusoidalen Venulen nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=12) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=14). MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

### 6.1.2.3 hepatozelluläre Apoptose

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der hepatozellulären Apoptose zeigte bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion ein leicht vermindertes Auftreten apoptotischer Hepatozyten bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 16-stündiger Endotoxinämie manifestierte sich die protektive Wirkung der CpG-ODN-Vorbehandlung in einer Verhinderung des drastischen Anstiegs der Anzahl apoptotischer Hepatozyten, der in der Kontrollgruppe beobachtet wurde (Abb. 14A).



**Abb. 14:** hepatozelluläre Apoptose (A) und deren zonale Verteilung (B) nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=12) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=14). MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

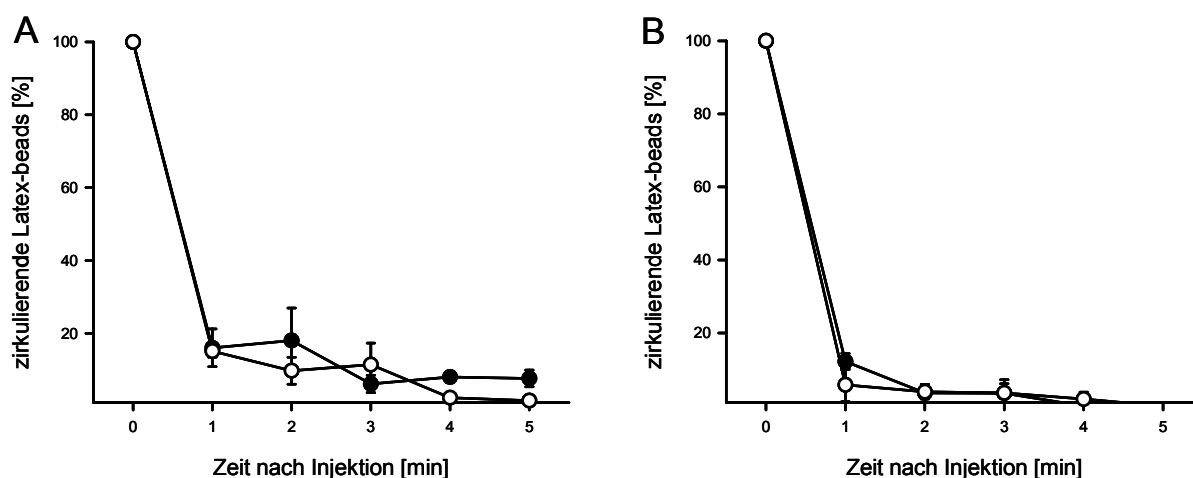
Die Analyse der zonalen Verteilung apoptotischer Hepatozyten zeigte in der Kontrollgruppe in allen drei Zonen eine deutliche Zunahme der Anzahl apoptotischer Hepatozyten

von 6 nach 16 Stunden. Dieser Anstieg war in CpG-ODN-präkonditionierten Tieren nicht zu beobachten, so dass sich nach 16-stündiger Endotoxinämie in allen drei Zonen in der CpG-ODN-Gruppe eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe fand (Abb. 14B).

#### 6.1.2.4 Kupfer-Zell-Phagozytose-Aktivität

Zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität der leberständigen Makrophagen (Kupffer-Zellen) wurden zu Versuchsende bei laufender Videoaufzeichnung Fluoreszein-markierte Latexpartikel (Latex-beads) intraarteriell injiziert und über einen Zeitraum von 5 Minuten verfolgt. Die zeitliche Kinetik der Aufnahme der Latex-beads in die Kupffer-Zellen diente zur Beurteilung der Phagozytose-Aktivität der Kupffer-Zellen.

Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen ergab keine Unterschiede der Phagozytose-Aktivität der Kupffer-Zellen. Sowohl 6h als auch 16h nach LPS-Injektion konnten keine signifikanten Unterschiede in der Abnahme der frei zirkulierenden Latex-beads zwischen beiden Versuchsgruppen gefunden werden (Abb. 15).



**Abb. 15:** Kupfer-Zell-Phagozytose-Aktivität nach 6-stündiger (A) und 16-stündiger Endotoxinämie (B) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Kreise, n=4) und Kontrolltieren (schwarze Kreise, n=4). MW  $\pm$  SEM.

#### 6.1.2.5 Effekte von fCpG-ODN auf die Mikrozirkulation nicht-endotoxämischer Lebern

Zur Untersuchung der Effekte von CpG-ODN auf die Lebermikrozirkulation gesunder Tiere, wurden Fluoreszein-markierte CpG-ODN (fCpG-ODN) intraperitoneal injiziert und am Tag 1 oder Tag 6 die Leber mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

An Tag 1 präsentierten sich die Lebern mit einer deutlichen Störung der Mikrozirkulation (Tabelle 6), die mit sinusoidalen Perfusionsausfällen und Oxygenierungsdefizit, Leukozy-



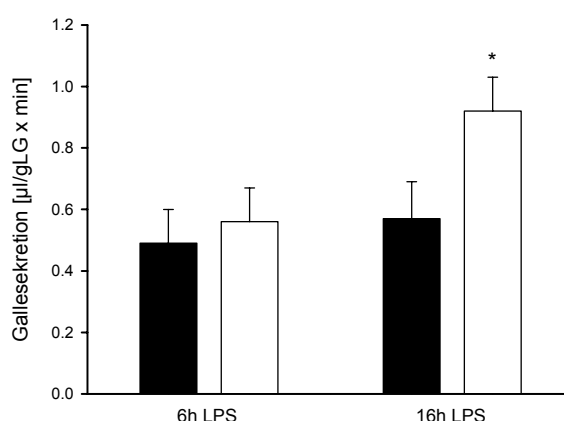
tensequestration und hepatozellulärer Apoptose einherging. Diese Veränderungen waren jedoch vollständig reversibel, und konnten am Tag 6 nach fCpG-ODN-Injektion nicht mehr nachgewiesen werden. Ebenso erholte sich die an Tag 1 gemessene Störung der Gallesekretionsleistung.

	Tag 1	Tag 6	p
<b>NADH-Autofluoreszenz [aE]</b>	133±15	82±7 *	0.019
<b>sinusoidales Perfusionsversagen [%]</b>	39.4±4.4	0.3±0.3 *	<0.001
<b>sinusoidale Leukostase [n/Lobulus]</b>	40±7	5±1 *	0.002
<b>hepatozelluläre Apoptose [n/Lobulus]</b>	2.5±0.2	0.4±0.4 *	0.007
<b>venuläre Leukozytenadhärenz [n/mm<sup>2</sup>]</b>	224±39	13±10 *	0.002
<b>Gallesekretion [µl/g x min]</b>	0.78±0.10	1.37±0.10 *	0.010

**Tabelle 6:** Mikrozirkulation, Leberfunktion und hepatozelluläre Apoptose an Tag 1 und 6 nach fCpG-ODN-Behandlung nicht-endotoxämischer Versuchstiere. MW ± SEM, \* p<0.05 vs. Tag 1.

## 6.2 Organfunktion und -integrität

### 6.2.1 Gallesekretion



**Abb. 16:** gesamtheptische Gallesekretion nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=12) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=14). MW ± SEM, \* p<0.05 vs. Kontrolle.

Die Analyse der gesamtheptischen Gallesekretion zeigte nach 6-stündiger Endotoxinämie bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine leicht vermehrte Gallensekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe. 16 Stunden nach Endotoxin-Injektion zeigten CpG-ODN-vorbehandelte Tiere eine signifikant verbesserte Gallesekretion als Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 16).

## 6.2.2 Plasma-Aktivität der Leberenzyme

Zur Durchführung der laborchemischen Untersuchung des Plasmas auf die Aktivitäten der Transaminasen (AST, ALT), der Glutamatdehydrogenase (GLDH) sowie der Cholinesterase (ChE) wurden die nach Versuchsende asservierten Plasmaproben aufgetaut und die Plasma-Aktivitäten spektrophotometrisch bestimmt (Tabelle 7).

	6h LPS			16h LPS		
	Kontrolle	CpG-ODN	p	Kontrolle	CpG-ODN	p
<b>AST</b> [U/l]	263±62	353±62	0.325	254±60	219±57	0.683
<b>ALT</b> [U/l]	100±37	122±29	0.328	153±56	88±41	0.391
<b>GLDH</b> [U/l]	134±84	94±36	1.000	81±24	32±16 *	0.037
<b>ChE</b> [U/l]	189±48	156±15	0.526	236±45	126±19	0.060

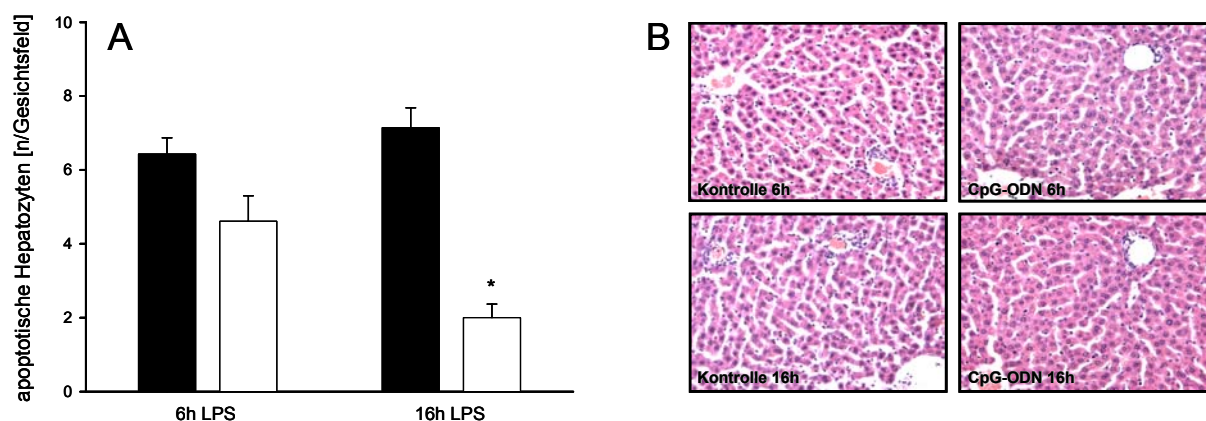
**Tabelle 7:** Plasma-Enzymaktivitäten nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (n=12) und Kontrolltieren (n=14). MW ± SEM, \* p<0.05 vs. Kontrolle.

Die Analyse der Plasma-Aktivitäten zeigte nach 6-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe höhere Aktivitäten der Transaminasen im Vergleich zur Kontrollgruppe, während die GLDH- und ChE-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger waren. Nach 16-stündiger Endotoxinämie fand sich bei den Tieren der CpG-ODN-Gruppe bei allen untersuchten Enzymen eine Reduktion der Plasma-Aktivität.

## 6.3 Morphologie und Entzündung

### 6.3.1 HE-Färbung

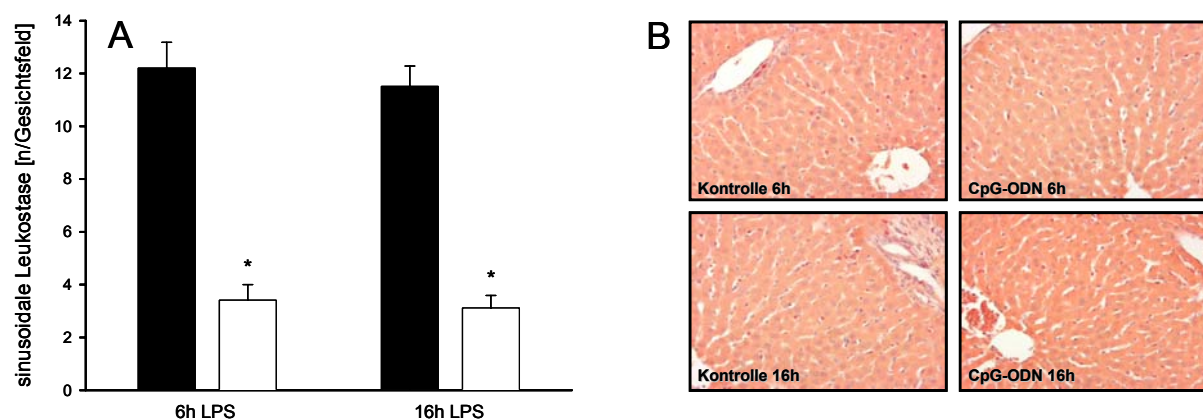
Die histologische Analyse der hepatozellulären Apoptose zeigte bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion in den Lebern von CpG-vorbehandelten Tieren eine deutliche Reduktion apoptotischer Hepatozyten verglichen mit Kontroll-Tieren. Nach 16-stündiger Endotoxinämie fand sich bei Tieren der Kontroll-Gruppe ein leichter Anstieg der Anzahl apoptotischer Hepatozyten. Die Lebern der CpG-ODN-Gruppe wiesen zu diesem Zeitpunkt eine signifikant reduzierte Anzahl apoptotischer Hepatozyten im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle auf (Abb. 17).



**Abb. 17:** hepatozelluläre Apoptose nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (A) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=8$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=7$ ). MW  $\pm$  SEM, \*  $p<0.05$  vs. Kontrolle. (B) repräsentative Beispiele HE-gefärbter Leber-Histologien. Vergrößerung  $\times 200$ .

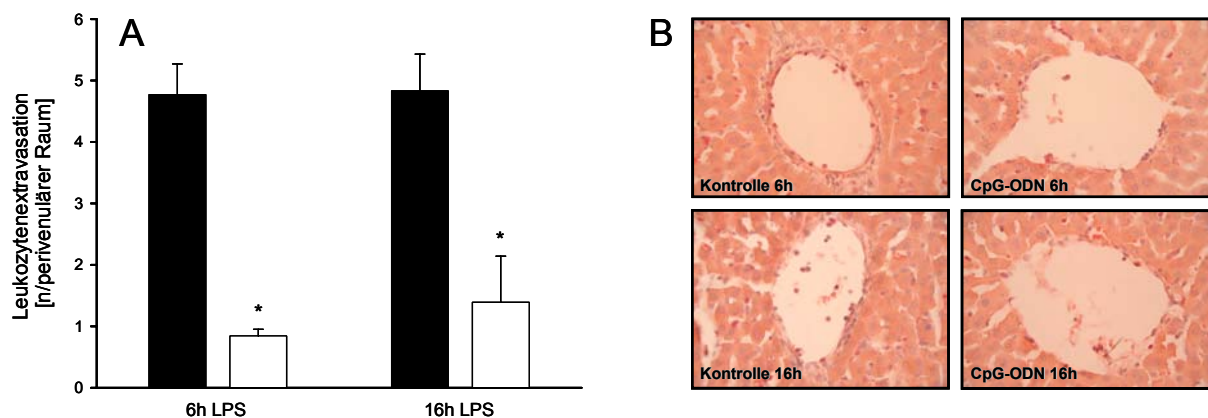
### 6.3.1 CAE-Färbung

Die Untersuchung der sinusoidalen Leukozytenakkumulation zeigte bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion in den Sinusoiden CpG-ODN-vorbehandelter Tiere signifikant weniger stagnierende Leukozyten als in Kontroll-Lebern. Nach 16-stündiger Endotoxinämie war ebenfalls in CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine signifikante Reduktion der leukozytären Stase in Sinusoiden zu finden (Abb. 18A).



**Abb. 18:** sinusoidale Leukostase nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (A) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=8$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=7$ ). MW  $\pm$  SEM, \*  $p<0.05$  vs. Kontrolle. (B) repräsentative Beispiele CAE-gefärbter Leber-Histologien. Vergrößerung  $\times 200$ .

Die Analyse der Leukozyten-Extravasation aus post-sinusoidalen Venulen in das umliegende Gewebe zeigte bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine signifikante Reduktion extravasierter Leukozyten im Vergleich zu Kontrolltieren. Diese Reduktion war auch nach 16-stündiger Endotoxinämie bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren gegenüber Kontrolltieren signifikant (Abb. 19).

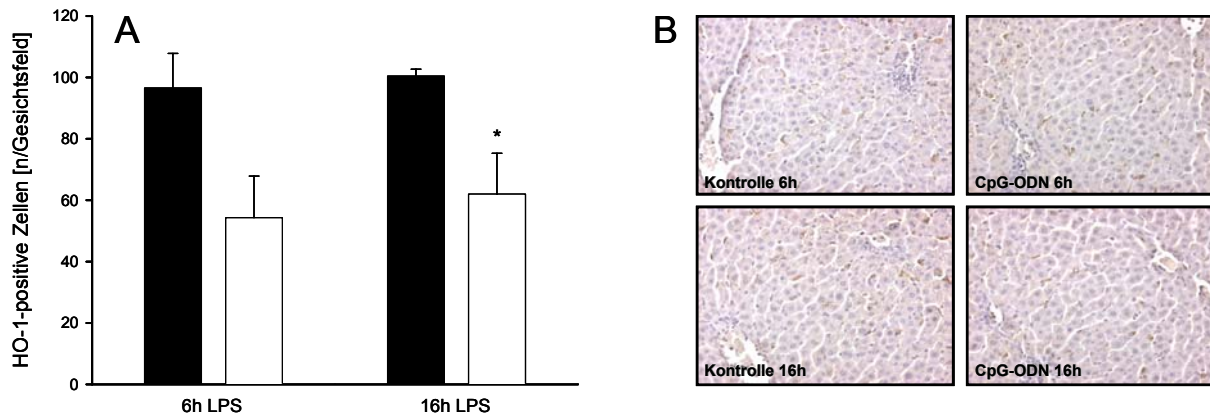


**Abb. 19:** venuläre Leukozytenextravasation nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=8) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=7). MW  $\pm$  SEM, \*  $p<0.05$  vs. Kontrolle. (**B**) repräsentative Beispiele CAE-gefärbter Leber-Histologien. Vergrößerung x400.

## 6.4 Proteinexpression

### 6.4.1 immunhistochemische Färbungen

#### 6.4.1.1 HO-1

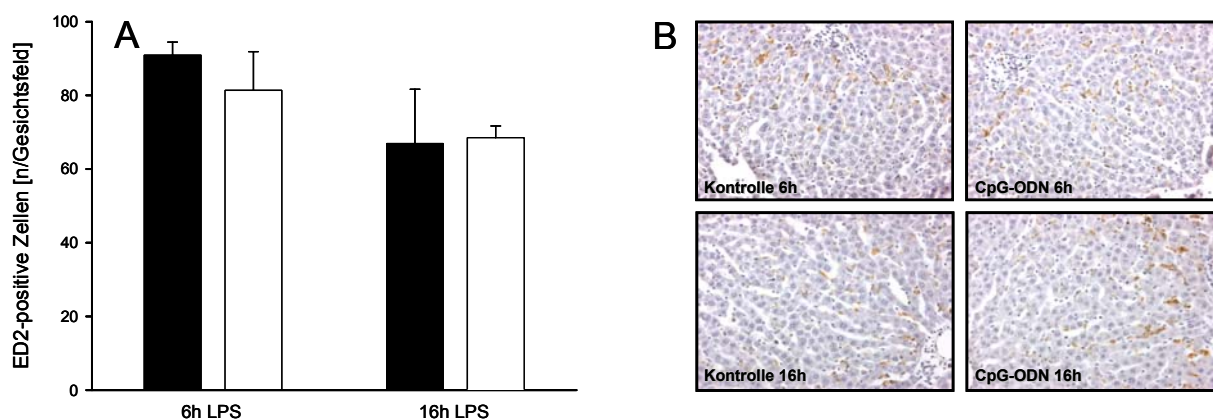


**Abb. 20:** HO-1-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=3) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=2). MW  $\pm$  SEM, \*  $p<0.05$  vs. Kontrolle. (**B**) repräsentative Beispiele von HO-1-Immunhistochemien. Vergrößerung x200.

Nach 6-stündiger Endotoxinämie zeigte die Auswertung von HO-1-gefärbten Immunhistochemien bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine deutlich verminderte Anzahl HO-1-positiver Zellen pro Gesichtsfeld im Vergleich zur Kontrollgruppe. 16 Stunden nach Endotoxininjektion fand sich eine statistisch signifikant geringere Anzahl HO-1-positiver Hepatozyten gegenüber der Kontrolle (Abb. 20).

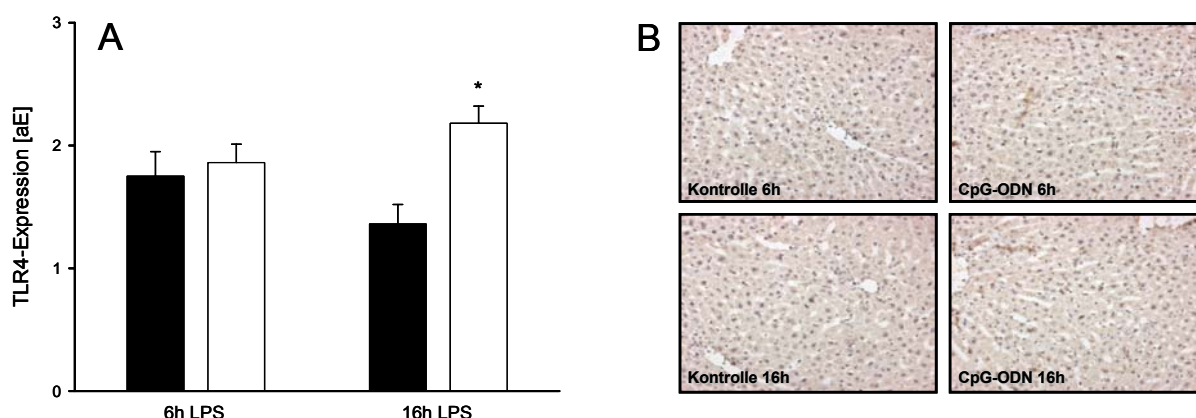
### 6.4.1.2 ED2

Nach 6- wie nach 16-stündiger Endotoxinämie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl ED2-positiver Zellen zwischen Tieren der CpG-ODN- und der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 21). 16 Stunden nach Endotoxininjektion zeigte sich eine deutliche Abnahme der Anzahl der Kupffer-Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 6 Stunden nach LPS-Injektion. Diese in beiden Versuchsgruppen zu verzeichnende Reduktion war jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abb. 21:** ED2-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=3$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=2$ ).  $MW \pm SEM$ . (**B**) repräsentative Beispiele von ED2-Immunhistochemien. Vergrößerung  $\times 200$ .

### 6.4.1.3 TLR4



**Abb. 22:** TLR4-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=3$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=2$ ).  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle. (**B**) repräsentative Beispiele von TLR4-Immunhistochemien. Vergrößerung  $\times 200$ .

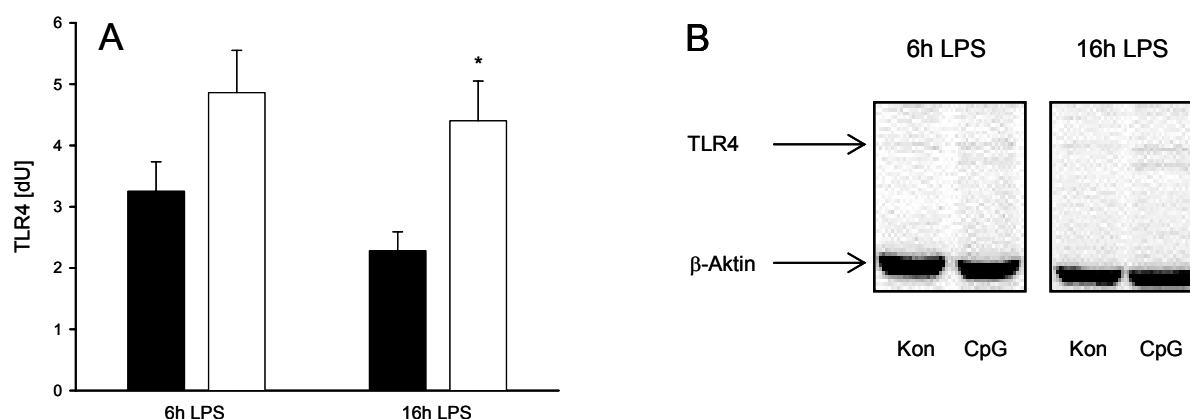
Die Auswertung der TLR4-Immunhistochemien zeigte nach 6-stündiger Endotoxinämie nur eine leicht vermehrte TLR4-Expression bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 22). Nach 16-stündiger Endotoxinämie fand sich bei Tieren der

Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion der TLR4-Expression im Vergleich zum Zeitpunkt 6h, während bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe ein deutlicher Anstieg im Vergleich zu Tieren der 6h-Gruppe zu beobachten war. Verglichen mit Kontrolltieren war die TLR4-Expression in Tieren der CpG-ODN-Gruppe 16h nach LPS-Injektion signifikant höher.

## 6.4.2 Western Blot

### 6.4.2.1 TLR4

Nach der Untersuchung der TLR4-Expression durch die Immunhistologie, wurde mit Hilfe eines Western Blots die Expression dieses Proteins quantifiziert (Abb. 23).



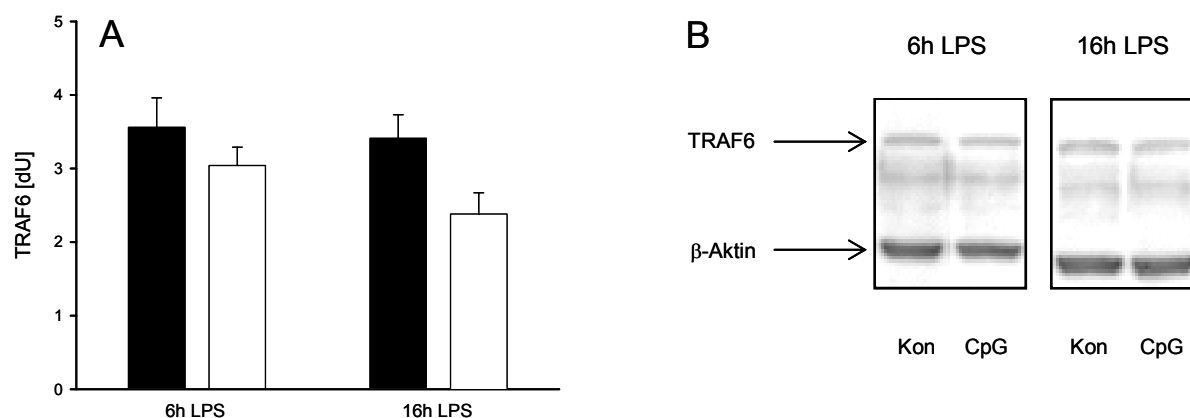
**Abb. 23:** TLR4-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen,  $n=4$ ) und Kontrolltieren (schwarze Säulen,  $n=4$ ).  $MW \pm SEM$ , \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle. (**B**) repräsentatives Beispiel eines TLR4-Western Blots

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Immunhistologie zeigte die proteinbiochemische Untersuchung ebenfalls einen Anstieg der TLR4-Expression nach 6-stündiger Endotoxinämie. Nach 16-stündiger Endotoxinämie war der signifikante Anstieg bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe gegenüber Tieren der entsprechenden Kontrolle noch stärker ausgeprägt (Abb. 23A,B).

### 6.4.2.2 TRAF6

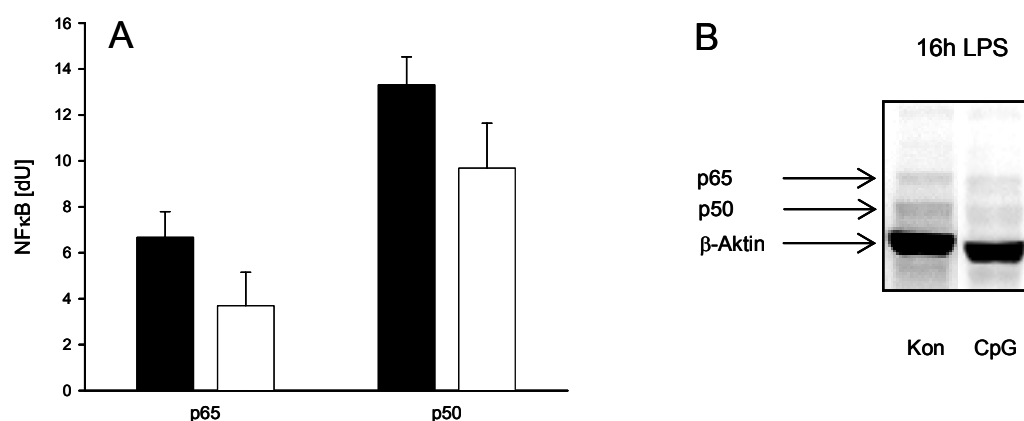
Die Analyse der Proteinexpression von TRAF6, welcher an der Signaltransduktion sowohl von TLR4 und TLR9 beteiligt ist, ergab bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe eine reduzierte Expression von TRAF6 im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe. Nach 16 Stunden war der Unterschied zwischen CpG-ODN- und Kon-

troll-Gruppe noch deutlicher ausgeprägt, auch wenn die statistische Analyse lediglich einen grenzwertigen p-Wert von 0.055 ergab (Abb. 24 A,B).



**Abb. 24:** TRAF6-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=4) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=4). MW ± SEM. (**B**) repräsentatives Beispiel eines TRAF6-Western Blots

#### 6.4.2.3 NFκB



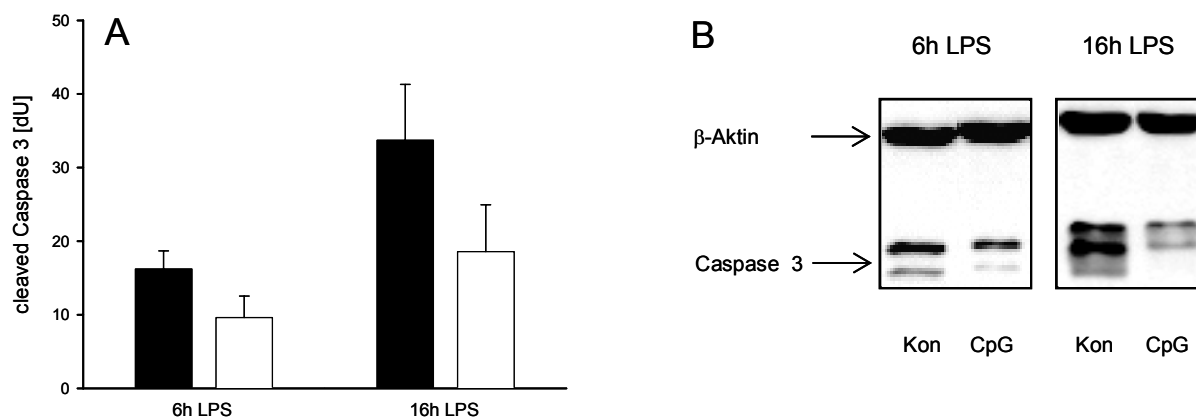
**Abb. 25:** Expression der NFκB-Untereinheiten p65 und p50 16h Endotoxinämie (**A**) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=4) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=4). MW ± SEM. (**B**) repräsentatives Beispiel eines NFκB-Western Blots

Die proteinbiochemische Analyse der NFκB-Expression zeigte bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe nach 16-stündiger Endotoxinämie eine deutliche Abnahme der beiden Untereinheiten p65 und p50 des Transkriptionsfaktors im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 25A,B).

#### 6.4.2.4 cleaved Caspase 3

Die Analyse der Proteinexpression der cleaved Caspase 3 als Effektorenzym des apoptotischen Zelltodes zeigte bereits 6 Stunden nach LPS-Injektion bei Tieren der CpG-

ODN-Gruppe eine reduzierte Expression von cleaved Caspase 3 im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 26A,B). Nach 16 Stunden waren die Proteinexpressionen beider Gruppen nahezu verdoppelt, der Unterschied zwischen CpG-ODN- und Kontroll-Gruppe war noch deutlicher ausgeprägt, wenn auch nicht signifikant (Abb. 26A,B).

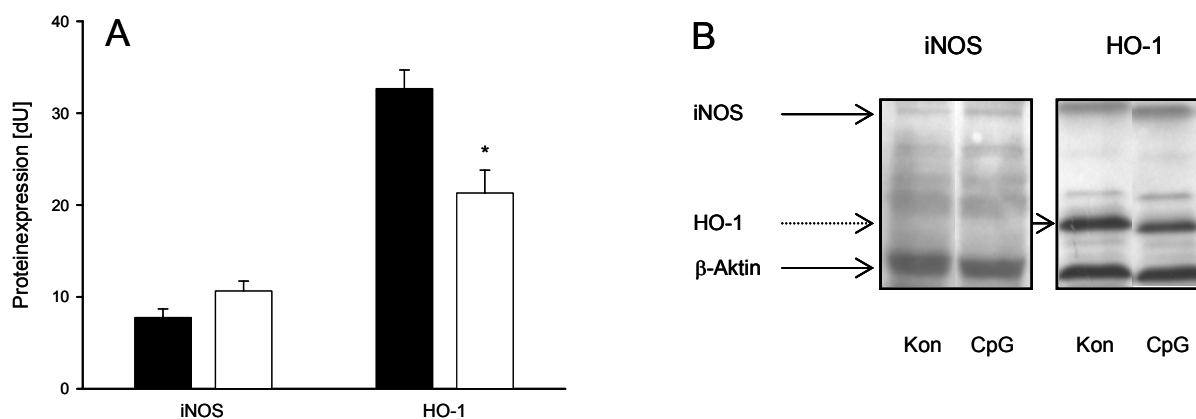


**Abb. 26:** cleaved Caspase 3-Expression nach 6h beziehungsweise 16h Endotoxinämie (A) in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=4) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=4). MW  $\pm$  SEM. (B) repräsentatives Beispiel eines cleaved Caspase 3-Western Blots

#### 6.4.2.5 iNOS, HO-1

Zur Untersuchung der Stressantwort wurde exemplarisch nach 16-stündiger Endotoxinämie die Expression der induzierbaren Isoform der Stickoxidsynthase (iNOS) sowie des induzierbaren Isoenzym der Häm-Oxygenase (HO)-1 mit Hilfe einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 27).

Die iNOS-Expression war bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht vermehrt, allerdings nicht statistisch signifikant. Die Auswertung der HO-1-Expression ergab bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe eine signifikant geringere Proteinexpression als bei Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 27A,B).



**Abb. 27:** iNOS- und HO-1-Expression nach 16h Endotoxinämie in CpG-ODN-präkonditionierten (weiße Säulen, n=4) und Kontrolltieren (schwarze Säulen, n=4). MW  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle. (B) repräsentative Beispiele eines iNOS- und HO-1-Western Blots.



## 6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen *in vivo*-Studie wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie der Rattenleber der Einfluss einer CpG-ODN-Vorbehandlung auf eine 6 Tage später erfolgende Endotoxin-Injektion und die daraus resultierenden Mikrozirkulationsstörungen und Parenchymveränderungen der Leber mit folgenden Ergebnissen untersucht:

- 1) Eine Präkonditionierung mit synthetischen CpG-Oligodeoxynukleotiden führt zu einer Reduktion der LPS-induzierten nutritiven Perfusionsstörung und parenchymatösen Gewebehypoxie der Leber.
- 2) CpG-ODN-Präkonditionierung führt zu einem Rückgang des Endotoxin-induzierten parenchymatösen Schadens, einer Verbesserung der zellulären Integrität und einer gesteigerten hepatozellulären Sekretionsfunktion.
- 3) CpG-ODN-Vorbehandlung bewirkt eine Reduktion der leukozytären Akkumulation in der Leber als Ausdruck einer verminderten inflammatorischen Reaktion auf die Endotoxinapplikation.
- 4) Die CpG-ODN-induzierte Toleranz gegen den Endotoxin-vermittelten Leberschaden wird vermittelt über einen Verbrauch an Schlüsselenzymen der TLR4-Signalkaskaden (TRAF6, NF $\kappa$ B) trotz kompensatorischer Überexpression von TLR4.
- 5) CpG-ODN-Präkonditionierung führt zu einer verminderten Stressantwort im Sinne einer reduzierten HO-1-Expression bei gleichzeitiger Induktion der iNOS zur Aufrechterhaltung der mikrovaskulären Perfusion.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Diskussion des Modells

In der vorliegenden Studie wurde eine Untersuchung der mikrohämodynamischen, zellulären und molekularen Beeinträchtigung der Leber während Endotoxinämie untersucht und die Effektivität einer Präkonditionierung mit immunmodulierenden CpG-ODN evaluiert.

Zum Studium der Pathogenese der Schädigung der Leber oder einzelner Zellpopulationen der Leber durch Endotoxin stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. Dabei muss das Modell problembezogen gewählt werden [WORTH et al., 1992], das heißt die der Studie zugrunde liegende Fragestellung muss in die Wahl des Modells mit einfließen. An isolierten und kultivierten Zellen können direkte Auswirkungen von Endotoxin auf die jeweilige Population, sowie die Pathomechanismen der Endotoxin-bedingten Zellschädigung direkt beobachtet werden [MAVIER et al., 1988]. In isoliert perfundierten Organen zeigen sich die Auswirkungen von Endotoxin auf das gesamte Organ, unter Einbeziehung verschiedener Zellpopulationen innerhalb des Organs [NOLAN et al., 1965]. Der Nachteil dieser *in vitro* beziehungsweise *ex vivo*-Methoden besteht darin, dass einzelne Zellpopulationen oder Organe isoliert betrachtet werden, und komplexe Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellpopulationen innerhalb eines Organs beziehungsweise zwischen verschiedenen Organen, sowie systemische Veränderungen im Rahmen der Endotoxinämie nicht mit berücksichtigt werden können [MCCUSKEY, 1986]. Dem gegenüber bietet die Untersuchung am intakten Organismus [VOLLMAR et al., 1993] den Vorteil, dass die Endotoxin-bedingte Schädigung der Leber vor dem Hintergrund der Wirkung des Endotoxins auf den gesamten Organismus sowie der Einflüsse anderer Organsysteme auf die Leber untersucht werden kann. Das auch in dieser vorliegenden Studie gewählte *in vivo*-Modell erlaubt zudem die Betrachtung des Endotoxin-vermittelten Leberschadens vor dem Hintergrund interferierender lokaler und systemischer Effekte, sowie positiver und negativer Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse [MENGER et al., 1993].

Der Nachteil der intravitalmikroskopischen Analyse der Lebermikrozirkulation besteht in der chirurgischen Manipulation des Versuchstiers, die eine Narkose des Tieres unvermeidbar macht. Das in diesen Versuchen verwendete Anästhetikum Pentobarbital wird nach intraperitonealer Applikation und nachfolgender Resorption über die Leber metabolisiert. Trotz der bekannten Induktion leberspezifischer Enzyme und seiner Einflüsse auf das kardiovaskuläre und respiratorische System, wurde Pentobarbital als Narkotikum verwendet, da es neben einer schnellen Narkoseeinleitung den Vorteil der Unterdrückung nozizeptiver Reflexe bietet, sowie trotz nur einmaliger Applikation eine lang anhaltende und tiefe Narkose bewirkt. Die Enzyminduktion ist bei der laborchemischen Analyse der Lebertransaminasen zu bedenken, wenn anhand der Serumkonzentrationen der Transaminasen auf das Ausmaß der Leberschädigung geschlossen wird. Ebenso gibt es Literaturhinweise, die über Einflüsse von Anästhetika auf die Gewebeoxygenierung berichten. An der Niere und am Herzen ist gezeigt worden, dass Barbiturate auf der Ebene der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-reduzierenden Dehydrogenase mit der mitochondrialen Atmungskette interferieren [CHANCE et al., 1962, RENAULT et al., 1987]. Bei der Verwendung von Pentobarbital als Anästhetikum ist die genaue Einhaltung der Dosis von 50mg/kg Körpergewicht essentiell, da die oben genannten unerwünschten Wirkungen in höherer Dosierung zu Blutdruckabfall, myokardialer Insuffizienz und Atemdepression führen [LONGNECKER et al., 1986].

Die chirurgische Präparation des Versuchstiers, insbesondere die Laparotomie sowie die Auslagerung des linken Leberlappens, die zur Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie unumgänglich sind, führen gegebenenfalls zu einer signifikanten Veränderung der Leberperfusion [GELMAN, 1976; BOHRER et al., 1981; GELMAN et al., 1987]. Während Gelman das chirurgische Trauma als Hauptursache für eine gestörte Leberperfusion im Rahmen abdominalen Operationen betrachtet, konnte Kerner mit Hilfe radioaktiv markierter Mikrosphären am Rattenmodell zeigen, dass eine Laparotomie die Leberperfusion nicht nachhaltig beeinträchtigt [KERNER, 1993].

Die Auslagerung des linken Leberlappens zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation erfolgte unter einer Rotation der Versuchstiere um 45° nach links entlang der Längsachse des in Rückenlage fixierten Tieres. Der Leberlappen wurde zur Verminderung der Atemexkursionen auf ein Stativ ausgelagert und die offen liegende Fläche mit Kochsalzlösung superfundiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei diesem Manöver besteht prinzipiell immer die Möglichkeit der Alteration der Leberperfusion. Aus methodologischen und ethischen Gründen sind jedoch vergleichende Messungen an nicht-narkotisierten und nicht-laparotomierten Tieren intravitalmikroskopisch nicht durchführbar. Durch die Rotation des Tieres und die Auslagerung der Leber auf ein Stativ konnte eine Beeinträchtigung

der Leberperfusion vermieden werden. Weiterhin wurde bei der Auslagerung der Leber auf das Stativ darauf geachtet, dass sich der linke Leberlappen auf Herzhöhe befand, um hydrostatische Effekte auf die Leberperfusion auszuschließen.

Die Endotoxinämie der Leber wurde durch eine einmalige intraperitoneale Injektion des Lipopolysaccharids von *E. coli*, Serotyp O128:B12 induziert. Das LPS wurde vor Applikation in steriler 0.9%-iger NaCl-Lösung in einer Konzentration von 2mg/ml gelöst und den Versuchstieren unter Ätherkurznarkose in einer Dosis von 5mg/kg KG intraperitoneal appliziert. Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Lebern erfolgte sechs [VOLLMAR et al., 2002] oder sechzehn Stunden [SCHÄFER et al., 2003] nach der Endotoxin-Applikation über einen Zeitraum von ca. einer halben Stunde. In der Literatur finden sich unterschiedliche experimentelle Ansätze zur Induktion einer Sepsis. Die Ligatur und anschließende Punktion des Coecums (CLP) dient der Induktion einer polymikrobiellen Sepsis [CHAUDRY et al., 1979], ebenso wie die Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis [WEIGHARDT et al., 2000]. Diese Modelle dienen der Simulation einer Peritonitis oder Sepsis, wie sie typischerweise nach abdominalchirurgischen Eingriffen auftreten. Das Erregerspektrum ist eine Mischflora aus Darmbakterien. Dem gegenüber steht der mehr theoretische Ansatz der intravenösen oder intraperitonealen Injektion von LPS [VOLLMAR et al., 1995], Lipoteichonsäure (LTA) [KAJIKAWA et al., 1998] oder Peptidoglykan [VIJTIUK et al., 1993], bei dem nur ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer oder -positiver Bakterien appliziert wird. Diese Methoden dienen der Induktion einer Endotoxinämie und erlauben weniger die Simulation eines klinischen Krankheitsbildes, sondern vielmehr der Aufklärung der Wirkung einzelner Toxine auf den Organismus und spezifische Reaktionen auf zellulärer und molekularer Ebene [JIRILLO et al., 2002]. Die letzteren Modelle sind jedoch zu bevorzugen, da sie eine standardisierte Antwort bewirken, während die Ausprägung der Sepsis bei CLP eine große Schwankungsbreite also eine schlechte Standardisierbarkeit zeigt.

In mehreren Studien kam es in der Anwendung der verschiedenen Modelle zur Untersuchung der Pathophysiologie der Sepsis und des septischen Schocks zu widersprüchlichen Ergebnissen [PAPPOVA et al., 1971; LUNDGARD-HANSEN et al., 1972; POSTEL et al., 1975]. Diese Widersprüche warfen Zweifel an der klinischen Relevanz der Endotoxin-Injektion zum Studium der Pathogenese der Sepsis auf. Auch über die Art und Dauer der Applikation des LPS – Bolus-Injektion versus langsame Infusion – gibt es widersprüchliche Hinweise in der Literatur [PETRUCCO et al., 1972; POSTEL et al., 1975]. In dieser vorliegenden Studie wurde das Modell der intraperitonealen Bolus-Injektion von *E. coli* - LPS gewählt – aufgrund seiner Standardisierbarkeit, der einfachen Durchführung unter Ätherkurznarkose und des Vergleichs der Ergebnisse mit anderen Studien [LI et al., 2004; EIPPEL et al., 2004].

Sechs Tage vor Endotoxin-Injektion wurde eine Gruppe Versuchstiere mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion immunstimulierender CpG-ODN vorbehandelt. CpG-ODN wurden vor Applikation in steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) in einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5}$  mol/l gelöst. Unter Ätherkurznarkose wurden den Versuchstieren 10 nmol CpG-ODN (entsprechend 500 µl PBS) injiziert [WEIGHARDT et al., 2000]. Der Kontrollgruppe wurde unter gleichen Bedingungen eine biologisch inerte Kontroll-DNA [LIPFORD et al., 1997] in gleicher Dosierung injiziert. In der Literatur finden sich CpG-ODN mit verschiedensten Sequenzen zur Stimulierung des Immunsystems. Ihnen gemeinsam ist das zentrale CpG-Motiv, das für die Immunstimulation verantwortlich ist. In der vorliegenden Studie wurde das in der Literatur als CpG-ODN Nummer 1668 bezeichnete Oligodeoxynukleotid [KRIEG et al., 1995] verwendet. In der Literatur tauchen unter der Bezeichnung CpG-ODN 1668 Unterschiede in der das CpG-Motiv flankierenden Basensequenz auf [WEIGHARDT et al., 2000; KRIEG et al., 1995 versus SPARWASSER et al., 1998; HACKER et al., 1998]. Diese betreffen jedoch nicht das zentrale Hexamer, welches für die Interaktion mit TLR9 verantwortlich ist. Dennoch ist bekannt, dass Variationen in den das zentrale Hexamer flankierenden Sequenzen sowie die Anzahl und Lage der CG-Motive innerhalb des ODN, die Affinität von CpG-ODN zu TLR9 verändern und Auswirkungen auf die Aktivierung TLR9-positiver Zellen haben [KLINMAN et al., 2003].

### 7.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Als Untersuchungstechnik wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Im Gegensatz zu zahlreichen anderen Methoden, wie beispielsweise der Laser-Doppler Flowmetrie [ARVIDSSON et al., 1988] oder der Mikrosphären-Technik [VOLLMAR et al., 1992], bietet die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den Vorteil, dass sie eine direkte Untersuchung und Darstellung der oberflächlichen Lebermikrozirkulation ermöglicht. Mit ihrer Hilfe können die Durchblutung von Arteriolen, Kapillaren und Venulen visualisiert und dynamische Veränderungen und Ereignisse beobachtet werden [MENDER et al., 1991]. Somit ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie den oben genannten indirekten Verfahren als direkte Methode überlegen.

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist eine etablierte Untersuchungsmethode, die bislang an vielerlei Tiermodellen, wie etwa Mäusen [RAPAPORT, 1977], Hamstern und Ratten [MENDER et al., 1991], Kaninchen [MCCUSKEY, 1966], aber auch an Großtieren wie Hunden und Affen [BLOCH, 1955] durchgeführt worden ist.

Prinzipiell steht neben der Epi-Illumination auch die Technik der Trans-Illumination zur Verfügung, nur ist diese Technik auf eine sehr dünne Gewebedicke angewiesen, was die Untersuchung der Leber trotz nur geringer Kapseldicke auf den äußersten Leberrand beschränkt. Diese Einschränkung limitiert aber zum einen die Anzahl der untersuchbaren Azini, zum anderen ist die Untersuchung des Leberrandes durch mögliche mechanische Manipulationen im Rahmen der Präparation und der Auslagerung wie durch mögliche Austrocknung während der Mikroskopie in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Zudem ist die Perfusion der Sinusoide im Randbereich physiologischerweise deutlich eingeschränkt [EGUCHI et al., 1991]. Dem gegenüber bietet die Technik der Epi-Illumination den Vorteil, dass die Mikroskopie an jeder beliebigen Stelle der Leberoberfläche durchgeführt werden kann, unabhängig von der Gewebedicke. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass die an der Leberoberfläche stattfindenden Prozesse denen im Organinneren gleichen [RAPPAPOORT, 1958]

Durch die intravenöse Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen wird die selektive Betrachtung und quantitative Auswertung verschiedener Parameter der Lebermikrozirkulation ermöglicht. Natrium-Fluoreszein dient durch Kontrast-Färbung des Mikrogefäßsystems der quantitativen Analyse der nutritiven sinusoidalen Perfusion. Bei jedem Versuchstier wurden mehrere Lobuli mikroskopiert und für die nachfolgende off-line Auswertung auf Videoband aufgenommen. Die Auswertung der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe standardisierter Schablonen, die auf den Monitor aufgelegt wurden, und definierte Lobulus-Segmente markierten. Auf den Schablonen war ebenfalls die zonale Unterteilung der Lobuli nach Rappaport markiert [RAPPAPOORT et al., 1973], was die Auswertung verschiedener Parameter innerhalb der drei Zonen (periportal – midzonal - perizentral) ermöglichte. In der vorliegenden Studie wurde in der midzonalen Zone der relative Anteil nicht-perfundierter Sinusoide untersucht. Dazu wurde bei der off-line-Auswertung midzonal eine virtuelle Linie senkrecht zur Blutflussrichtung gezogen. Die Anzahl perfundierter und nicht-perfundierter Sinusoide, die diese Linie senkrecht kreuzten, wurde ermittelt und zueinander in Relation gesetzt. Diese Methode der quantitativen Auswertung der Lebermikrozirkulation wurde bereits bei verschiedenen Untersuchungen der Lebermikrozirkulation im Rahmen von Endotoxinämie [VOLLMAR et al., 1993, 2002], Ischämie/Reperfusion [VOLLMAR et al., 1994] und Lebertransplantation [POST et al., 1992] wiederholt angewandt.

Resultante der nutritiven Perfusion ist die Gewebeoxygenierung, die unter anderem mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Analyse der Leberoberfläche ohne vorherige Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen im UV-Licht beurteilt und quantifiziert werden kann [BURKHARDT et al., 1998]. Dieses Verfahren macht sich die Eigenfluoreszenz des Nikotinadenin-Dinukleotids (NADH) zunutze, welches bei Beleuchtung mit ultraviolettem Licht angeregt wird

und unter Zerfall der Doppelbindungen seinerseits Licht emittiert. NADH akkumuliert im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung bei mangelnder Sauerstoff-Versorgung der Zelle. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gewebegehalt an NADH, welcher wiederum negativ mit der Gewebeoxygenierung korreliert. Die Autofluoreszenz kann nach Ausbleichen der Vitamin A-speichernden Ito-Zellen, welche unter UV-Beleuchtung ebenfalls fluoreszieren, densitometrisch gemessen werden und wird in arbiträren Einheiten wiedergegeben [VOLLMAR et al., 1997]. Auf die von Suematsu und Mitarbeitern propagierte Erholungsphase für die NADH-Autofluoreszenz nach Ausbleichen der Ito-Zellen kann hierbei verzichtet werden [SUEMATSU et al., 1993; BURKHARDT et al., 1998].

Zur Untersuchung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, steht als Farbstoff zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten Rhodamin 6G zur Verfügung. Nach intravenöser Applikation reichert sich Rhodamin 6G in den Granula von Leukozyten und Thrombozyten an. Die Beleuchtung der Leber mit Licht der Wellenlänge 530-560nm [VOLLMAR et al., 1994b, 2002; EISEL et al., 2004] im Grünlicht-Filter erlaubt die selektive Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen. Innerhalb der oben genannten Schablonen wurden in den verschiedenen Zonen der hepatischen Sinusoide, sowie in post-sinusoidalen Venulen Leukozytenstase beziehungsweise -adhärenz quantitativ ausgewertet. Die direkte Visualisierung der dynamischen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie und deren Aufzeichnung auf Videokassette erlauben eine wiederholte off-line Analyse und Auswertung der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung. Die Unterscheidung zwischen Leukozyten und Thrombozyten erfolgt problemlos anhand der Zellgröße. Innerhalb der Sinusoide wurde die Leukostase untersucht. Dabei wurden in den 3 Zonen diejenigen Leukozyten als stagnierend definiert, die sich während des Beobachtungszeitraums von 20 Sekunden nicht bewegten [VOLLMAR et al., 1994c; SCHÄFER et al., 2003; EISEL et al., 2004]. Dieselbe Definition wurde zur Untersuchung der Leukozyten-Adhäsion in post-sinusoidalen Venulen angewandt [EISEL et al., 2004].

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung des apoptotischen Zelltodes während der Endotoxinämie wurde den Versuchstieren Bisbenzimid (Hoechst 33342) intravenös appliziert. Bisbenzimid färbt *in vivo* die Nuclei der Hepatozyten und ermöglicht bei Verwendung eines UV-Filters die Beurteilung der Kernmorphologie und der Chromatinkondensation [HACKER et al., 2000], und erlaubt somit eine Aussage über den apoptotischen Zelltod von Hepatozyten. Die intravitalmikroskopische Untersuchung des apoptotischen Zelltodes ist eine standardisierte Methode, und ist sowohl *in vitro* [BOER et al., 2003], *ex vivo* [EL-GIBALY et al., 2004] wie *in vivo* [SCHÄFER et al., 2003] verwendbar. Diese Untersuchung ist insofern bedeutsam, als dass gezeigt worden ist, dass die hepatozelluläre Apoptose ein früher und

möglicherweise sogar kausaler Faktor des entzündlichen Leberversagens [LEIST et al., 1995] und des Ischämie/Reperfusionsschadens [RUDIGER et al., 2003] darstellt. Zudem ist bekannt, dass apoptotische Hepatozyten chemotaktisch auf Neutrophile wirken, und somit die Entzündungsreaktion im Rahmen einer Sepsis verstärken können [LAWSON et al., 1998]. Derart rekrutierte Leukozyten emigrieren ins Leberparenchym und tragen durch Freisetzung toxischer Mediatoren zum zellulären Schaden bei.

Die Visualisierung der Kupffer-Zellen und deren Phagozytose-Aktivität erfolgte indirekt. Den Versuchstieren wurde eine standardisierte Menge ( $3 \times 10^8$ /kg KG, [VOLLMAR et al., 1994a]) fluoreszierender Latex-Partikel intraarteriell appliziert. Diese so genannten Latex-beads mit einem Durchmesser von  $1.1\mu\text{m}$  werden von den Kupffer-Zellen phagozytiert, und die Geschwindigkeit der Elimination der Partikel aus dem Blut lässt Rückschlüsse auf die Phagozytose-Aktivität der Kupffer-Zellen zu. Aus früheren tierexperimentellen Studien ist bekannt, dass die Kupffer-Zell-Phagozytoseaktivität bei Ischämie/Reperfusion der Leber [VOLLMAR et al., 1994a] unterdrückt wird, und dass eine Blockade der Kupffer-Zellen durch Gadolinium-Chlorid ( $\text{GdCl}_3$ ) die Leber gegen einen deletären LPS-induzierten parenchymatösen Schaden schützt [VOLLMAR et al., 1996]. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die Präkonditionierung mit CpG-ODN die Kupffer-Zell-Phagozytoseaktivität unter endotoxämischen Bedingungen beeinflusst.

Als Indikator der Gewebeoxygenierung wie auch der Stoffwechselleistung steht die gesamt-hepatische Gallesekretion als funktioneller Parameter zur Verfügung [BOWERS et al., 1987]. Bowers konnte in Experimenten an Ratten zeigen, dass die Einschränkung der Galleproduktion das Ausmaß eines Gewebeischämieschadens widerspiegelt. Ebenso gibt die Gallesekretion Auskunft über Sauerstoffversorgung der Leber, da er mit dem lebervenösen Sauerstoffpartialdruck [LARSEN et al., 1976] und dem Gehalt an energiereichen Phosphaten in Hepatozyten [KARWINSKI et al., 1989] korreliert. Der Vorteil der Messung der Gallesekretion besteht darin, dass sie kontinuierlich durchgeführt werden kann, und ist somit anderen Verfahren, die eine Entnahme und Aufbereitung von Lebergewebe erfordern (chromatographischer Nachweis energiereicher Phosphate, hepatozelluläre Proteinsynthese), aus praktischer Sicht überlegen. Es ist bekannt, dass während Sepsis [VON ALLMEN et al., 1992] und Ischämie/Reperfusion [LEE et al., 2000] die Gallesekretion abnimmt. Ursache ist die mangelnde Sauerstoffausschöpfung während einer Sepsis beziehungsweise die Mangelversorgung während einer Ischämie. Ziel der Untersuchung in dieser Studie war, über Unterschiede in der Gallensekretion Rückschlüsse auf die Leberfunktion und somit eine mögliche protektive Wirkung der Präkonditionierung mit CpG-ODN zu ziehen.



Als Maß der zellulären Integrität und des Ausmaßes des hepatozellulären Schadens wurden die Lebertransaminasen im Plasma spektrophotometrisch bestimmt. Eine Erhöhung der Transaminasenkonzentrationen spricht für eine gestörte zelluläre Integrität der Hepatozyten, die das Übertreten der zytoplasmatischen Enzyme ins Blut ermöglicht und sich dort bei jeder Schädigung der hepatozellulären Plasmamembran findet. Ein fortgeschrittener zellulärer Schaden, wie etwa Zellnekrose, wird laborchemisch anhand der Erhöhung der Konzentrationen mitochondrialer Enzyme manifest. Es wurde nachgewiesen, dass der Übertritt zytoplasmatischer Enzyme in das Blut über eine akute vesikuläre Freisetzung passiert, welche jedoch nicht automatisch mit Zelluntergang einhergeht [NISHIMURA et al., 1986]. Somit ist eine Erhöhung der Konzentrationen zytosolischer Enzyme auch bei reversiblen Zellschädigungen nachweisbar, und ist auch zum Nachweis eines akuten und temporären Zellschadens beziehungsweise einer Störung der Zellmembran-Integrität geeignet.

Um die Ergebnisse der Intavitalmikroskopie weiter zu festigen, wurden aus dem nach Versuchsende asservierten Gewebe Histologien gefertigt und mit Hämatoxylin – Eosin (HE) gefärbt. In der Literatur findet sich eine lange Diskussion über die beste Methode zum Nachweis der hepatozellulären Apoptose. Biochemische Verfahren, wie immunhistochemische Färbungen von Gewebsschnitten gegen Enzyme, die während des apoptotischen Zelltodes aktiv sind (Caspasen) oder wie der Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Assay), propagiert von Clavien und anderen Autoren [KOHLE et al., 1999], stehen in dieser Diskussion einer rein morphologischen Betrachtung der Zellkerne gegenüber [JAESCHKE et al., 2001]. Letzten Endes gilt die morphologische Beurteilung am HE-Schnitt als der Gold-Standard, die jedoch von vielen Autoren zur Untermauerung der Ergebnisse mit biochemischen Methoden kombiniert wird [GUJRAL et al., 2001]. Die für den apoptotischen Zelltod charakteristischen morphologischen Kriterien sind Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und -marginierung und die Ausbildung von „apoptotic bodies“ [HACKER, 2000]. In dieser Studie wurde in je 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt lichtmikroskopisch der relative Anteil an apoptotischen Hepatozyten anhand der oben genannten kernmorphologischen Kriterien ermittelt.

Apoptotische Hepatozyten wirken ihrerseits als chemotaktisches Signal auf Neutrophile [LAWSON et al., 1998] und verstärken somit die im Rahmen einer Sepsis auftretende Entzündungsreaktion. Zur Beurteilung der leukozytären Infiltration der Leber wurden zusätzliche Gewebeschnitte mit AS-D Chlorazetatesterase (CAE) angefärbt, und die Leukozytensequestrierung und -extravasation in der Leber analysiert [EIPER et al., 2004]. Gezählt wurden wiederum 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt die in Sinusoiden stagnierenden Leukozyten, wie die in das peri-venuläre Bindegewebe extravasierten Leukozyten.

Zur immunhistochemischen Untersuchung der Leber wurden Färbungen mit Antikörpern gegen ED2 zur Untersuchung der Kupffer-Zellen angefertigt [DIJKSTRA et al., 1987, 1995]. Während die intravitalmikroskopische Untersuchung mit Hilfe der Latex-beads zur Untersuchung der Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen diente, zielte die immunhistochemische Färbung der Kupffer-Zellen auf die Klärung der Frage ab, ob und inwieweit sich die Vorbehandlung mit CpG-ODN auf die Zahl der Kupffer-Zellen auswirkt. Kupffer-Zellen sind als ortsständige Makrophagen der Leber von zentraler Bedeutung bei der Entzündungsreaktion auf Endotoxin [SU, 2002b]. Sie haben physiologischerweise die Aufgabe, Toxine und Bakterien aus dem Splanchnikusgebiet zu eliminieren. Entsprechend dieser Filterfunktion findet sich die Mehrzahl der Kupffer-Zellen im periportalen Bereich der Leberlobuli. Ebenso verfügen die periportal gelegenen Kupffer-Zellen über eine stärkere Phagozytose-Aktivität als die midzonal oder perizentral gelegenen, da sie verstärkt gegenüber toxischen Substanzen exponiert sind. Kupffer-Zellen kommt somit eine zentrale Bedeutung in der Immunabwehr zu. Sie reagieren auf eine Aktivierung mit der Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1, -6), und tragen somit auch bei inadäquater und überschießender Aktivierung zum Leberschaden bei. In der Pathophysiologie des Leberschadens, etwa im Rahmen der Sepsis [KELLER et al., 1985] oder der alkoholischen Leberzirrhose [THURMAN, 1998] sind Kupffer-Zellen maßgeblich beteiligt.

Um Veränderungen des Lebergewebes durch die Vorbehandlung mit CpG-ODN auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Als Ergänzung zur intravitalmikroskopischen und histologischen Untersuchung des apoptotischen Zelltodes wurde die Expression von „cleaved“ Caspase 3 analysiert. „Cleaved“ Caspase 3 geht aus der Spaltung der Procaspase 3 hervor und stellt die aktivierte Form dieses an der Regulation des Apoptoseprozesses beteiligten Enzyms dar. Allgemein wird durch Binden von proapoptotischen Mediatoren (TNF- $\alpha$ , FasL) an Oberflächenrezeptoren intrazellulär eine so genannte „Initiator“-Caspase 8 aktiviert, die ihrerseits aus den Proenzymen verschiedener „Effektor“-Caspasen die aktiven Isoformen abspaltet. Diese Effektor-Caspasen spalten intrazelluläre Substrate, was letztlich zum koordinierten Zelluntergang führt [COHEN, 1997] und in morphologischen und biochemischen Veränderungen während der Apoptose sichtbar wird.

Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit Veränderungen innerhalb der Signalkaskaden stattfinden, die die Wirkungen von CpG-ODN und LPS vermitteln, wurden Western Blot-Analysen zur Expression von TNF-Rezeptor-assoziiertem Faktor 6 (TRAF6) und TLR4 durchgeführt. TLR4 ist Teil des LPS-Rezeptorkomplexes [CHOW et al., 1999] und vermittelt die Signalweiterleitung des gebundenen LPS über die Zellmembran. Die Signalkaskaden von LPS sowie von CpG-ODN werden über die weiter „downstream“ gelegenen Signalmoleküle

TRAF6 und nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) vermittelt, wobei Letzterer das Signal in den Zellkern weiterleitet.

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1 systemische Parameter**

Makrohämodynamisch fanden sich zwischen den beiden untersuchten Gruppen nach sechsständiger Endotoxinämie keine signifikanten Unterschiede. Die im Rahmen einer Endotoxinämie und beim septischen Schock bekannten hyper- und hypodynamischen Phasen ließen sich in dieser Studie nur andeutungsweise rekonstruieren. Kontrolltiere zeigten initial einen höheren mittleren arteriellen Blutdruck als Tiere der CpG-ODN-Gruppe. Nach 16-stündiger Endotoxinämie hingegen war der MAP bei Tieren der Kontrollgruppe deutlich erniedrigt, entsprechend der Sepsis-assoziierten Hypotonie. CpG-ODN-präkonditionierte Tiere zeigten keine initiale Hypertonie, insbesondere aber keine Reduktion des MAP nach 16-stündiger Endotoxinämie. Es lässt sich daher feststellen, dass die CpG-ODN-Applikation einer Hypotonie nach 16-stündiger Endotoxinämie entgegenzuwirken vermag.

Die Analyse der Atemgaspartialdrücke zeigte zwischen den beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings präsentierten sich CpG-ODN-vorbehandelte Tiere mit einem höheren Sauerstoffpartialdruck als Tiere der Kontrollgruppen. Während die Tiere der CpG-ODN-Gruppen zu Versuchbeginn im Vergleich zu Kontrolltieren einen leicht erhöhten pCO<sub>2</sub> aufwiesen, zeigten sie jedoch im Verlauf der Experimente einen deutlich geringer ausfallenden Anstieg des pCO<sub>2</sub>. Somit konnte in unserem Modell die Vorbehandlung mit CpG-ODN der Entwicklung einer respiratorischen Insuffizienz, und damit einhergehend der Einstellung einer azidotischen Stoffwechsellage entgegenwirken. In der Tat waren nach 16-stündiger Endotoxinämie bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe ein geringerer Abfall des pH-Wertes messbar, auch wenn diese Unterschiede nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe waren.

Die Auswertung des weißen Blutbildes ergab zu beiden untersuchten Zeitpunkten bei Tieren der Kontrollgruppe erhöhte Leukozytenwerte, wobei nur in Einzelfällen extreme Leukozytosen beziehungsweise Leukopenien auftraten. Im statistischen Gruppenvergleich fanden sich keinerlei signifikante Unterschiede. Die in der Literatur beschriebene Abnahme der peripheren Leukozytenzahlen nach Endotoxin-Injektion [VOLLMAR et al., 1995] ließ sich in unseren Versuchen nicht nachweisen, da diese bereits 30min nach LPS-Injektion auftritt und

nur etwa zwei Stunden andauert [SHORT et al., 1999; DEPLAEN et al., 2000]. Danach steigen die Leukozytenzahlen im peripheren Blut an bis etwa 8h nach LPS-Gabe. Die Wahl des Untersuchungszeitpunktes in dieser Studie (6h nach LPS-Injektion) erlaubte demnach nicht, die LPS-induzierte Leukopenie nachzuweisen, da dieser in der Phase des Ansteigens der peripheren Leukozytenzahlen liegt. Die Präkonditionierung mit CpG-ODN konnte diesen Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich abschwächen. Die differenzierte Betrachtung des Blutbildes macht deutlich, dass sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten bei Tieren der CpG-ODN-Gruppen der Anteil an Monozyten und Granulozyten zu Gunsten der Lymphozyten verringert. Dies entspricht den Erkenntnissen von Davila und Koautoren, die an Mäusen nach CpG-ODN-Applikation eine Vermehrung von T-Lymphozyten fanden [DAVILA et al., 2002]. In unseren Versuchen wurde keine weitere Differenzierung der Lymphozyten vorgenommen, somit lässt sich keine definitive Aussage darüber machen, ob die von uns beobachtete Zunahme der Lymphozyten ein Ausdruck der gestärkten Th1-dominierten Immunlage ist.

### **7.2.2 Mikrozirkulation**

Die systemische Endotoxinämie führte nach 6 und 16 Stunden zu einer massiven Beeinträchtigung der sinusoidalen Perfusion mit Perfusionsausfällen von 23% beziehungsweise 28%. Diese deutlich beeinträchtigte Mikrozirkulation spiegelt sich auch in den hohen NADH-Werten von jeweils etwa 150aU wider, was die aus der Mikrozirkulationsstörung resultierende ausgeprägte Gewebshypoxie bestätigt. Durch die Vorbehandlung mit CpG-ODN verringerte sich das mikrovaskuläre Perfusionsversagen signifikant auf Werte von 15% und 17% nach 6 bzw. 16 Stunden Endotoxinämie. Die daraus resultierende verbesserte Gewebeoxygenierung kam durch die im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduzierten NADH-Werte zum Ausdruck. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Daten anderer Studien zur Pathophysiologie des LPS-induzierten Leberschadens [SCHÄFER et al., 2002; EIPEL et al., 2004]. Durch die Präkonditionierung mit CpG-ODN konnte das Perfusionsversagen zwar signifikant verringert, jedoch nicht auf physiologische Verhältnisse normalisiert werden. Dies zeigt, dass sich durch CpG-ODN die Mikrozirkulation zwar deutlich beeinflussen lässt, die Leber jedoch nicht vollständig gegen den endotoxinämischen Schaden geschützt werden kann. Allgemein ist bekannt, dass die Störung der Mikrozirkulation signifikant zur Manifestation des Organversagens während Endotoxinämie beiträgt [VOLLMAR et al., 1993]. Zugrunde liegend vermutet man toxische Wirkungen des im Rahmen der Endotoxinämie freigesetzten TNF- $\alpha$ . Diese beinhalten Schwellung und Kongestion von Endothelzellen [ISAKA et al., 2000], aktivierende Wirkungen auf das Gerinnungssystem, sowie die Freisetzung des vasokonstringierend wirkenden Mediators Endothelin-1 [EAKES et al., 1998]. Die Protektion gegen das

durch LPS ausgelöste Perfusionsversagen durch CpG-ODN basiert vermutlich auf einer Abschwächung der pro-inflammatorischen Zytokin-Reaktion. Ebenso kann man vermuten, dass CpG-ODN über die Aktivierung der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) und der daraus folgenden Freisetzung des Vasodilators Stickstoffmonoxid (NO) [UTAISINCHAROEN et al., 2002] der LPS-induzierten Vasokonstriktion entgegen wirken und somit zur verbesserten Perfusion beitragen. Im Gewebe CpG-ODN-vorbehandelter Tiere konnte in unseren Versuchen ebenfalls eine erhöhte Expression der iNOS gegenüber Kontrolltieren nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Erkenntnisse von Utaisincharoen et al. und dient zugleich als möglicher Erklärungsversuch der verbesserten Mikrozirkulation nach CpG-ODN-Vorbehandlung.

Neben protektiven Effekten gegenüber Infektionen ist in der Literatur eine Eigentoxizität von CpG-ODN beschrieben [SPARWASSER et al., 1997]. Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit sich diese Eigentoxizität auf die Lebermikrozirkulation auswirkt, wurde zusätzlichen Tieren lediglich CpG-ODN intraperitoneal appliziert. Am ersten Tag nach Injektion manifestierte sich die toxische Wirkung der CpG-ODN in einer massiven Störung der sinusoidalen Perfusion, die sich mit Werten von fast 40% Perfusionsausfall sogar weitaus ausgeprägter darstellte, als die durch LPS verursachte Mikrozirkulationsstörung. Am sechsten Tag nach CpG-ODN-Applikation war die sinusoidale Durchblutung allerdings wieder vollständig hergestellt. Analog zu der massiven Perfusionsstörung am ersten Tag nach CpG-ODN-Gabe ergab die densitometrische Messung der NADH-Autofluoreszenz deutlich erhöhte NADH-Spiegel. Mit Wiederherstellung der physiologischen Perfusionsverhältnisse am sechsten Tag nach CpG-ODN-Applikation zeigten sich die NADH-Werte wieder deutlich reduziert. Diese Normalisierung der Perfusionsverhältnisse und der damit einhergehenden Gewebeoxygenierung legt den Schluss nahe, dass das Perfusionsversagen sowie die Oxygenierungsstörung nach 6 oder 16 Stunden Endotoxinämie nicht mehr durch eine toxische Wirkung der CpG-ODN, sondern lediglich durch LPS bedingt sind. Ebenso lassen diese Daten vermuten, dass die anfänglich toxische Wirkung von CpG-ODN im Sinne einer Präkonditionierung eine Toleranz gegenüber einer folgenden Endotoxinämie induziert. Der initiale Schaden geht möglicherweise auf eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung als Reaktion auf CpG-ODN zurück, während die Persistenz der CpG-ODN in Sinusuferzellen zu einer lang andauernden Freisetzung vasorelaxierender Mediatoren führt und die Mikrozirkulation vor dem LPS-vermittelten Perfusionsversagen schützt.

Die Mikrozirkulationsstörung der Leber war von einer starken inflammatorischen Antwort auf das injizierte Endotoxin begleitet. Die Entzündungsreaktion bestätigte sich durch die ausgeprägte mikrovaskuläre Leukozytenrekrutierung. Sowohl in den Sinusoiden wie auch in

den post-sinusoidalen Venulen fanden sich zum Teil massive Ansammlungen von Entzündungszellen, wie es auch aus zahlreichen anderen Studien bekannt ist [VOLLMAR et al., 1993]. Die Leukozytenrekrutierung in der Leber konnte sowohl intravitalmikroskopisch als auch mit Hilfe der Standard-Histologie nachgewiesen werden. Die Histologie erlaubte zudem eine Aussage über die Extravasation der Leukozyten aus den post-sinusoidalen Venulen in das perivaskuläre Bindegewebe. Nach CpG-ODN-Vorbehandlung konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine signifikant reduzierte Leukozytenakkumulation in der Leber gezeigt werden. Die intravitalmikroskopischen Beobachtungen konnten wiederum durch die Standard-Histologie untermauert werden, indem sich auch dort eine signifikante Abnahme der Anzahl rekrutierter Leukozyten nachweisen ließ. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Weighardt und Koautoren [WEIGHARDT et al., 2000], die in einer Studie zur polymikrobiellen Sepsis zeigen konnten, dass die CpG-ODN-vermittelte Protektion mit einer Akkumulation von Neutrophilen und einer Hochregulierung phagozytorischer Rezeptoren einhergeht. Dieser Widerspruch mag bedingt sein durch die Unterschiede in der Erzeugung der Sepsis / Endotoxinämie und durch die Unterschiede unspezifischer Abwehrmechanismen, die durch die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis [WEIGHARDT et al., 2000] oder die alleinige Injektion von LPS angestoßen werden [ECHTENACHER et al., 2001].

Die alleinige Injektion von CpG-ODN führte am ersten Tag nach Applikation zu einer massiven Leukozytenakkumulation sowohl in Sinusoiden, wie auch in den post-sinusoidalen Venulen. Diese durch die Eigentoxizität der CpG-ODN verursachte Leukozytenrekrutierung war bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung der Leber sechs Tage nach alleiniger CpG-ODN-Injektion nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass sich die entzündliche Frühreaktion auf CpG-ODN nach einigen Tagen zurückbildet und eine Toleranz induziert.

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Phagozytoseaktivität der Kupffer-Zellen ergab zu beiden untersuchten Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und CpG-ODN vorbehandelten Tieren. Ebenso hatte die Vorbehandlung mit CpG-ODN keine Auswirkung auf die Anzahl der Kupffer-Zellen, wie anhand von immunhistochemischen Gewebeschnitten mit Färbung gegen ED2 nachgewiesen werden konnte. Bislang gibt es nur einen einzigen Bericht über Effekte von CpG-ODN auf Kupffer-Zellen [SCHUCHMANN et al., 2004]. Hingegen ist bekannt, dass CpG-ODN stimulierend auf Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen wirken, und bei diesen Zellen eine Freisetzung von Mediatoren mit einer Th1-dominierten Immunantwort bewirken [KLINMAN et al., 1996]. Diese Th1-Antwort wurde in mehreren tierexperimentellen Studien als Ausdruck der CpG-ODN-induzierten Toleranz gegenüber verschiedenen Infektionen betrachtet [CHU et al., 1997; KRIEG et al., 1998]. CpG-

ODN sind sogar in der Lage, eine Th2-dominierte Immunsituation zugunsten einer Th1-Antwort zu modulieren [SUR et al., 1999]. Unsere Ergebnisse sind mit anderen Studien im Konsens dahingehend, dass CpG-ODN 2 bis 3 Tage benötigen, um eine optimale Protektion *in vivo* zu bewirken [KRIEG et al., 1998; SUR et al., 1999]. Diese durch CpG-ODN-Präkonditionierung bedingte Toleranz dauert bis zu 6 Wochen an [SUR et al., 1999].

Der Endotoxin-bedingte parenchymatöse Schaden konnte intravitalmikroskopisch durch die Manifestation von Apoptose-spezifischen kernmorphologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung mit CpG-ODN zeigte nach 6-stündiger Endotoxinämie lediglich eine leichte Reduktion, nach 16-stündiger Endotoxinämie jedoch eine signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Hepatozyten. Die histomorphologische Untersuchung des Lebergewebes anhand von HE-Schnitten bestätigte die intravitalmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse und zeigte zu beiden untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Rückgang der hepatozellulären Apoptoserate. Proteinbiochemisch fand sich beim Nachweis der aktivierten Caspase 3 mittels Western Blot-Analyse ebenfalls zu beiden untersuchten Zeitpunkten ein deutlicher, wenngleich nicht signifikanter Rückgang der aktiven Form dieses Enzyms. Diese Ergebnisse spiegeln den bereits *in vivo* gefundenen geringeren Anteil apoptotischer Hepatozyten in CpG-ODN-vorbehandelten Tieren wider. Als Ausdruck der toxischen Nebenwirkungen der CpG-ODN zeigte die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leber am ersten Tag nach CpG-ODN-Applikation deutlich mehr Hepatozyten mit Apoptose-typischen Kernveränderungen. Das Ausmaß des apoptotischen Zelluntergangs war dem durch eine sechs-stündige Endotoxinämie vergleichbar. Im Gegensatz dazu präsentierten die Lebern sechs Tage nach CpG-ODN-Injektion vollkommen physiologische Kernmorphologien, die Häufigkeit apoptotischer Hepatozyten war auf Normalwerte zurückgegangen. Die gesteigerte Apoptoserate als initiale Reaktion auf CpG-ODN-Injektion mag auf eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  [GAO et al., 2001] und die nachfolgende Induktion apoptotischer Signalkaskaden zurückgehen.

Als Marker der zellulären Integrität wurden die Plasma-Konzentrationen der Transaminasen sowie der Glutamatdehydrogenase (GLDH) und Cholin-Esterase untersucht. Nach 6-stündiger Endotoxinämie waren AST und ALT bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren nicht signifikant erhöht und GLDH und ChE nicht signifikant erniedrigt. Als Ausdruck der Protektion der CpG-ODN-Vorbehandlung waren nach 16-stündiger Endotoxinämie bei vorbehandelten Tieren alle untersuchten Plasma-Marker deutlich erniedrigt, die GLDH sogar signifikant. Somit spiegelt sich der durch CpG-ODN-Präkonditionierung reduzierte LPS-induzierte Gewebeschaden auch laborchemisch wider. Insbesondere die signifikante Verminderung des Plasma-Spiegels der GLDH als mitochondriales Enzym zeigt die reduzierte mitochondriale

Schädigung. Diese findet ihren Ausdruck ebenso in einer verbesserten Sauerstoff-Utilisation, die mit erniedrigten NADH-Spiegeln einhergeht, wie auch in einer verringerten Freisetzung an mitochondrialen pro-apoptotischen Molekülen, wie beispielsweise Cytochrom c [MORIN et al., 2004].

Als Parameter der Leberzellfunktion wurde die gesamtheptatische Gallesekretion untersucht. Nach 6h und 16h Endotoxinämie zeigten sich deutlich eingeschränkte Sekretionsraten von  $0.49\mu\text{l/g} \times \text{min}$  beziehungsweise  $0.57\mu\text{l/g} \times \text{min}$ . Bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren zeigte sich bereits nach 6-stündiger Endotoxinämie eine leichte Steigerung der Gallesekretion. Nach 16-stündiger Endotoxinämie war bei Tieren der CpG-ODN-Gruppe die Gallesekretion signifikant verbessert und erreichte mit  $0.92\mu\text{l/g} \times \text{min}$  nahezu Normwerte [ABDEL SALAM et al., 2005]. Die Wiederherstellung der Gallesekretion als ein Parameter der Fähigkeit der Leber, aktive energieabhängige Prozesse durchzuführen, spiegelt neben der zellulären Integrität und der intakten Funktionsfähigkeit des Organs auch die wieder ausreichende Oxygenierung durch Wiederherstellung der Mikrozirkulation und Sauerstoffutilisation wider.

Die Applikation von CpG-ODN alleine führte am ersten Tag nach Injektion zu einer deutlichen Einschränkung der Gallesekretion auf Werte von  $0.78\mu\text{l/g} \times \text{min}$ . Im Gegensatz dazu fand sich am sechsten Tag nach alleiniger CpG-ODN eine normalisierte Gallesekretion mit Werten von  $1.37\mu\text{l/g} \times \text{min}$ . Diese Werte demonstrieren ebenfalls die initial hepatotoxische Wirkung der CpG-ODN mit einer deutlichen Einschränkung der Lebersyntheseleistung. Diese initiale Toxizität ist jedoch reversibel, und führt bei Persistenz der CpG-ODN in Sinusuferzellen der Leber zu einer Protektion gegenüber einem nachfolgenden endotoxinämischen Stimulus im Sinne einer Toleranzinduktion. Zudem unterstreichen diese Ergebnisse erneut die signifikant negative Korrelation zwischen Lebersekretionsleistung und mikrovaskulärem Perfusionsversagen.

Zur Klärung der Frage, ob und inwieweit CpG-ODN nach intraperitonealer Injektion in der Leber zu finden sind, wurden Fluoreszein-markierte CpG-ODN injiziert. Am ersten Tag wie auch noch nach sechs Tagen konnten intravitalmikroskopisch Fluoreszenzsignale in Sinusuferzellen detektiert werden, die am ehesten Endothelzellen und Kupffer-Zellen entsprechen. Diese Bilder zeigten deutlich, dass CpG-ODN nach intraperitonealer Applikation in die Blutbahn aufgenommen und in die Leber eingeschwemmt werden. Dort werden sie von immunkompetenten Zellen phagozytiert und persistieren über mindestens sechs Tage. Dies legt die Vermutung nahe, dass CpG-ODN neben einer systemischen Wirkung vermutlich auch lokal wirksam sind. Da aber die fluoreszierenden CpG-ODN nur in einer geringen Anzahl an Zellen nachzuweisen waren, erscheint es wahrscheinlicher, dass die CpG-ODN-vermittelte Protektion eher aus den frühen eigentoxischen Effekten resultiert, und der damit



einhergehende Leberschaden diese Zellen gegen die nachfolgende Endotoxinämie im Sinne einer Präkonditionierung „abhärtet“. Nichtsdestoweniger lässt sich nicht ausschließen, dass das Persistieren der CpG-ODN zu einer kontinuierlichen Freisetzung löslicher Mediatoren (z.B. TNF- $\alpha$ ) führt, die das Gewebe kontinuierlich stimulieren und lokal zu den systemischen Effekten der CpG-ODN und der Präkonditionierung beitragen.

### 7.2.3 Mechanismen

Zur Untermauerung der mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und der Histologie gewonnenen Ergebnisse, wurden Western Blot-Analysen zur Expression verschiedener an der Signalweiterleitung beteiligter Proteine durchgeführt. Gleichzeitig sollte auf diese Weise versucht werden, mögliche Mechanismen für die durch die CpG-ODN induzierte Toleranz gegen LPS zu finden.

CpG-ODN werden durch Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) gebunden [HEMMI et al., 2000]. Die Lokalisation des Rezeptors ist Gegenstand anhaltender Diskussionen, da widersprüchliche Hinweise für dessen zelluläre Verteilung vorliegen. Es gibt Belege dafür, dass CpG-ODN an Zell-Oberflächen-Rezeptoren binden. Liang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CpG-ODN-beschichtete Sepharose-Partikel in gleichem Maß aktivierend auf humane B-Zellen wirken wie freie CpG-ODN [LIANG et al., 2000]. Unterstützend konnten Eaton-Bassiri und Mitarbeiter mittels Durchflußzytometrie und immunhistochemischer Färbung die Expression von TLR9 auf der Zelloberfläche von humanen mononukleären Zellen nachweisen [EATON-BASSIRI et al., 2004]. Im Gegensatz dazu zeigen Leifer und Koautoren, dass TLR9 intrazellulär, nämlich im endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird [LEIEFR et al., 2004]. Dieses Ergebnis wird unterstützt von anderen Beobachtungen, die zeigen, dass eine Internalisierung von bakteriellen DNA-Sequenzen beziehungsweise von CpG-ODN für die Entfaltung ihrer biologische Aktivität notwendig ist [KRIEG et al., 2000]. Zudem ist bekannt, dass Hemmstoffe endosomaler Reifung, wie beispielsweise Chloroquin, eine CpG-ODN-vermittelte Zellaktivierung verhindern [MACFARLANE et al., 1998], was zeigt, dass eine zelluläre Aufnahme durch unspezifische Endozytose und nachfolgende endosomale Reifung an der Zell-Aktivierung durch CpG-ODN beteiligt zu sein scheint. Ebenso ist die Azidifizierung endosomaler CpG-ODN bei der intrazellulären Ausbildung von reaktiven Sauerstoffspezies und nachfolgender NF $\kappa$ B-Aktivierung von großer Bedeutung [YI et al., 1998].

Durch CpG-ODN wird nach Weiterleitung des Signals von TLR9 an zytoplasmatische Proteine eine mehrstufige Signalkaskade aktiviert, die letztlich zur Aktivierung und nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B führt. Ein wichtiges Protein innerhalb dieser

Signalkaskade stellt der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor 6 (TRAF6) dar, dessen sich die Signalkaskaden von TLR9, wie auch vom LPS-Rezeptor TLR4 bedienen. Die zentrale Bedeutung von TRAF6 wird darin deutlich, dass TLR9-Liganden in TRAF6-defizienten Mausemakrophagen keine Zell-Aktivierung hervorrufen können, und die Zell-Aktivierung durch TLR4-Liganden deutlich abgeschwächt und zeitlich verzögert abläuft [GOHDA et al., 2004].

In der vorliegenden Studie untersuchten wir, ob durch die Vorbehandlung mit CpG-ODN die Expression von TRAF6 verändert wird. Sowohl nach 6- wie auch nach 16-stündiger Endotoxinämie fand sich bei den CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine Verminderung der Expression von TRAF6 um 15% bzw. 30%. Dies lässt spekulieren, dass die Wechselwirkung und Aktivierung von TLR9 durch CpG-ODN zu einer Sequestration oder einem Verbrauch von Signalmolekülen wie TRAF6 führt. Dies stünde in Analogie zu dem, was für die gemeinsamen Signalwege von TLR2 und TLR4 vorgeschlagen wurde [HIRSCHFELD et al., 2001]. Dies würde zusätzlich auch erklären, warum eine nachfolgende Belastung mit LPS, das von TLR4 gebunden wird und zur Zellaktivierung führt, weniger gravierend ausfällt: TLR4 könnte über die durch CpG-ODN verbrauchten Signalproteine zur Signalweiterleitung nicht mehr verfügen. Unterstützt wird dies durch Studien an Zellkulturen, in denen eine paradoxe Hochregulation von TLR4-mRNA als Antwort auf „tolerisierende“ Dosen LPS gezeigt werden konnte [AN et al., 2002; CALVANO et al., 2003]. Die verringerte Menge an TRAF6 könnte intrazellulär zu der von uns gefundenen verringerten Aktivierung von NF $\kappa$ B führen, und somit nur eine abgeschwächte Reaktion auf LPS erlauben. Als kompensatorischer Versuch wäre eine gesteigerte Expression von TLR4 denkbar, die in unseren Versuchen auch beobachtet werden konnte. Muzio und Mitarbeiter haben zeigen können, dass eine Exposition von verschiedenen Blutzellen gegen bakterielle Produkte in diesen Zellen sowie auch in Hepatozyten eine gesteigerte Expression von TLR4 hervorruft [MUZIO et al., 2001]. Ebenso konnten sie zeigen, dass IFN- $\gamma$  zu einer erhöhten Expression von TLR4 führt. Da CpG-ODN bekannterweise zu einer IFN- $\gamma$ -Freisetzung führen [YAMAMOTO et al., 1992], wäre andererseits denkbar, dass dieses durch CpG-ODN induzierte IFN- $\gamma$  für die gesteigerte Expression von TLR4 verantwortlich ist. Eine direkte Hochregulierung von TLR4 durch CpG-ODN erscheint eher unwahrscheinlich, da CpG-ODN ihrerseits nur von TLR9 erkannt und gebunden werden. Somit stehen zwei spekulative Möglichkeiten der TLR4-Erhöhung als Erklärungsversuch zur Verfügung.

Als Ausdruck der Toleranz und des nur eingeschränkt zur Verfügung stehenden LPS-Signalweges fand sich in unseren Versuchen bei CpG-ODN-vorbehandelten Tieren eine Verringerung der NF $\kappa$ B-Aktivierung. Dieses Ergebnis stimmt mit *in vitro*-Ergebnissen überein, die zeigen konnten, dass eine Vorbehandlung mit CpG-ODN zu einer verminderten LPS-

vermittelten NF $\kappa$ B-Aktivierung [JIN et al., 2002] und zu einer reduzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung [SMITH et al., 2004] führt. Insbesondere eine längere Vorbehandlung von Makrophagen mit CpG-ODN bewirkt eine Suppression der LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung [CRABTREE et al., 2001]. Die Mechanismen der CpG-ODN vermittelten Toleranz gegen nachfolgende LPS-Belastung ähneln somit stark denen einer LPS-induzierten Endotoxintoleranz [FLOHE et al., 1999].

### 7.3 Schlussfolgerung

Die pathophysiologischen Umstände der Leberdysfunktion bei Endotoxinämie beinhalten als Korrelat eine gestörte mikrovaskuläre Perfusion [VOLLMAR et al., 1993], die eine eingeschränkte Gewebeoxygenierung mit Schädigung der zellulären Integrität und des Zellstoffwechsels bewirkt. Endstrecke ist der apoptotische Zelluntergang. Die Leukozyten-Sequestration als Korrelat der entzündlichen Organveränderung [JAESCHKE et al., 1991] verstärkt die parenchymatöse Schädigung durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen und anderen zytotoxischen Mediatoren [JAESCHKE et al., 1998]. Die Leukozytenakkumulation und Extravasation ins umliegende Parenchym, vermittelt durch verschiedene Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Leukozyten [CARLOS et al., 1994; KLINTMAN et al., 2002], gilt als limitierender Schritt in der Progression des Leberversagens bei Endotoxinämie und Sepsis [HEWETT et al., 1993].

In unserem Modell der intravitalmikroskopischen Untersuchung der Leberdysfunktion im Rahmen einer Endotoxinämie konnten eine signifikante Reduktion der Mikrozirkulationsstörung, der Zellschädigung und der Begleitentzündung durch eine Präkonditionierung mit immunmodulierenden CpG-ODN nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie als etablierter Untersuchungsmethode zur direkten Beobachtung der Lebermikrozirkulation konnte die Akkumulation der CpG-ODN in der Leber bereits einen Tag nach intraperitonealer Applikation nachgewiesen werden, und somit neben systemischen Effekten der CpG-ODN auch eine direkte lokale Wirkung in der Leber postuliert werden. Ob CpG-ODN auch einen direkten Effekt auf Hepatozyten haben, wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Diese Möglichkeit ist jedoch durchaus gegeben, da Hepatozyten sowohl die Transkripte für TLR9 wie auch die Adaptermoleküle MyD88 und MD-2 exprimieren können [LIU et al., 2002]. Dies lässt zumindest die Vermutung zu, dass CpG-ODN neben indirekten Effekten, die sich aus den Wechselwirkungen von Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Endothelzellen ergeben, auch direkte Effekte auf Hepatozyten haben könnten. Darauf konnten wir jedoch zumindest

intravitalmikroskopisch keinen Hinweis finden, da wir keine fluoreszierenden CpG-ODN in Hepatozyten nachweisen konnten.

Aus den gewonnenen Daten kann zusammenfassend der Schluss gezogen werden, dass CpG-ODN zum einen eine intrinsische Hepatotoxizität aufweisen, die in der vorliegenden Form zwar noch nicht vorbeschrieben, wohl aber im Bezug auf systemische Reaktionen (wie etwa septischer Schock [SPARWASSER et al., 1997]) bekannt ist. Diese Eigentoxizität verursacht eine deutliche Mikrozirkulationsstörung der Leber, einhergehend mit erhöhter hepatozellulärer Apoptoserate und intrahepatischer Leukozytenrekrutierung. Zum anderen wirken CpG-ODN nach längerer Applikationszeit im Sinne einer Präkonditionierung protektiv auf die Leber gegenüber einer nachfolgenden Endotoxinämie. Unsere Daten geben Anhalt für ein therapeutisches Fenster, innerhalb dessen die toxischen Effekte von CpG-ODN auf die Leber überwunden sind, und die Toleranz-induzierenden Effekte gegenüber einer Endotoxin-Exposition noch erhalten sind. In Übereinstimmung mit anderen Modellen, die protektive Effekte von CpG-ODN bei verschiedensten Arten von Insulten nachgewiesen haben, scheinen protektive Effekte 2-3 Tage nach CpG-ODN-Applikation [KRIEG et al., 1998; SUR et al., 1999], sicher aber nach einer Woche [WEIGHARDT et al., 2000], aufzutreten. Das therapeutische Fenster dauert Literaturangaben zufolge bis zu 2 Wochen nach einer einmaligen CpG-ODN-Applikation [OXENIUS et al., 1999; ELKINS et al., 1999]. Freidag und Mitarbeiter konnten sogar sechs Wochen nach CpG-ODN-Applikation eine signifikant erhöhte Wirksamkeit einer BCG-Impfung gegen *Mycobacterium tuberculosis* nachweisen [FREIDAG et al., 2000]. Ebenso scheint eine Applikation von CpG-ODN rückwirkend bis zu 3 Wochen nach stattgehabter Infektion mit *Leishmania major* protektiv wirksam zu sein [ZIMMERMANN et al., 1998].

Die Dauer der protektiven Wirkung einer einmaligen intraperitonealen Applikation von CpG-ODN gegenüber einer nachfolgenden Endotoxinämie wurde in dieser vorliegenden Studie nicht getestet, wohl aber konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN trotz einer initialen Eigentoxizität, die ihrerseits ebenfalls Mikrozirkulationsstörungen der Leber verursacht, nach sechs Tagen die Endotoxin-vermittelte Leberdysfunktion signifikant reduzieren können und in Sinusuferzellen nachweisbar sind. Die Tatsache, dass CpG-ODN nach Endozytose nicht degradiert werden, sondern intrazellulär nachzuweisen bleiben, unterstützt zum einen die Theorie, dass CpG-ODN ihre biologische Wirkung erst nach unspezifischer Endozytose entfalten, zum anderen lässt sich vermuten, dass die intrazellulär persistierenden CpG-ODN eine kontinuierliche Freisetzung von Mediatoren bewirken, und so das umliegende Gewebe kontinuierlich präkonditionieren.

## 7.4 Perspektive

Diese Studie liefert Informationen darüber, dass eine Kurzzeitbehandlung mit CpG-ODN zu einer Schädigung der Lebermikrozirkulation und deutlichem Parenchymschaden führt. Diese Schädigung ist jedoch nach einer längeren Expositionszeit vollständig reversibel und führt innerhalb eines gewissen therapeutischen Fensters zu einer Protektion der Leber gegen eine ansonsten massiv schädigende Endotoxinämie.

Abschließend stellt sich die Frage, ob und inwieweit CpG-ODN für den klinischen Gebrauch und überhaupt für den Einsatz an Menschen geeignet sind.

Problem der CpG-ODN ist die in Tierversuchen mehrfach beschriebene und auch in unserer Studie gefundene Eigentoxizität. Entsprechend der drastischen Schädigungen, die sich somit aus der Verwendung von CpG-ODN als Medikament ergeben könnten, bleiben die unerwünschten Wirkungen der CpG-ODN gegenüber dem therapeutischen Nutzen abzuwägen. Aus Studien an humanen Blutzellen ist bekannt, dass diese zwar auf CpG-ODN mit einer Aktivierung reagieren [TAKESHITA et al., 2001], wohl aber starke interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Aktivierbarkeit durch eine bestimmte DNA-Sequenz bestehen [LEIFER et al., 2003]. Somit scheint der klinische Einsatz einer Mischung mehrerer verschiedener CpG-Motiv-haltiger DNA-Sequenzen sinnvoll zu sein. Insgesamt betrachtet ist aus prä-klinischen Studien ein breites Wissensspektrum über CpG-ODN und ihre Wirkungsweisen geschaffen worden. Über die Veränderung der DNA-Sequenz konnten sogar Spezies-spezifische Unterschiede in der Wirksamkeit von CpG-ODN nachgewiesen werden [BAUER et al., 2001]. Diese Unterschiede gehen auf geringe Spezies-abhängige Variationen im CpG-ODN-Rezeptor (TLR9) zurück. Daraus ergibt sich jedoch die Schwierigkeit, beispielsweise CpG-ODN mit einem bestimmten Wirkungsprofil im Mausmodell zu designen und nachfolgend auf den Menschen zu übertragen.

Insgesamt sind aktuell CpG-ODN weniger bedeutsam als eigenständiges Medikament, sondern vielmehr als Medikamentenzusatz bzw. als Adjuvans. Neben vielen prä-klinischen, tierexperimentellen Studien, die die protektive Wirkung von CpG-ODN gegenüber verschiedensten Arten von Infektionen sowie verschiedenen Neoplasien [CARPENTIER et al., 2000] untersucht haben, wurden CpG-ODN auch als Zusatz zu Impfstoffen [DAVIS et al., 1998], wie auch zu Chemotherapeutika [WEIGEL et al., 2003; PRATESI et al., 2005] und monoklonalen Antikörpern [WOOLRIDGE et al., 1997; WARREN et al., 2000] zur Tumorthherapie verwendet.

Mittlerweile liegen auch erste klinische Erfahrungen über die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvans vor. In zwei kanadischen Kliniken wurde im Rahmen einer doppelblinden Phase I-Studie ein speziell designtes CpG-ODN namens CpG 7909 als Zusatz zu einer konventionellen Engerix-B® Impfung gegeben, was im Vergleich zum Kontrollkollektiv die Responder-Rate sowie die Antikörper-Titer signifikant verbesserte [COOPER et al., 2004]. 2003 führte ColeyPharma eine klinische open-label Studie (Phase II) zur Wirksamkeit von CpG 7909 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom durch, in der der Zusatz von CpG 7909 zur Chemotherapie zu einer 95%-igen Verbesserung der Ansprechrate der Therapie und zu einem 88%-ig verbessertem medianen Überleben führte. Selbiger Pharma-Konzern führt momentan klinische Studien zur Wirksamkeit von CpG 7909 beim kutanen T-Zell-Lymphom (CTLC) und beim Melanom (Stadium III / IV) durch. Seit Dezember 2004 werden in Cleveland, Ohio Patienten für eine Studie rekrutiert. Fragestellung ist die Wirksamkeit von CpG 7909 als Adjuvans einer Hepatitis B-Impfung bei HIV-positiven und -negativen Patienten [www.clinicaltrials.gov]. Carpentier und Mitarbeiter rekrutieren seit September 2005 nach prä-klinischen Erfahrungen zur Wirksamkeit von CpG-ODN beim Glioblastom Patienten für eine Phase-II-Studie zur Immuntherapie mit CpG-ODN beim malignen Glioblastom. Ebenso laufen weitere klinische Studien, die therapeutische Effekte von CpG-ODN beim Nierenzellkarzinom, Basalzellkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom und Mammakarzinom (in Kombination mit Herceptin®) untersuchen. Seit Januar 2006 läuft eine Studie, die die Wirkung von CpG 10101 auf Hepatitis C-infizierte Patienten bei gleichzeitiger Therapie mit Ribavirin und pegylierten Interferonen untersucht. 2008 endet die erste Studie, in der Patienten, die bereits mit CpG 7909 behandelt wurden, nach maximaler Anzahl an Chemotherapien weiterhin mit CpG 7909 behandelt werden, sofern die Neoplasie nicht fortschreitet.

Seit März 2005 arbeiten die Pharmakonzerne ColeyPharma und Pfizer zusammen an der Weiterentwicklung des ersten kommerziellen TLR9-Agonisten ProMune™, sowie dessen Testung in Phase III-Studien. Inwieweit ProMune™ Einzug in die Klinik halten wird, ist bislang nicht abzusehen. Ebenso lässt sich momentan noch nicht absehen, ob sich eine prä-operative Immuntherapie chirurgischer Patienten mit erhöhtem Risiko für Infektionen oder septische Komplikationen im klinischen Alltag etablieren wird.

## 8 LITERATUR

1. Abdel Salam OM, Baiuomy AR, El-Shenawy SM. Effect of cysteamine on bile secretion in the rat. *Pharmacol Rep.* 2005;57(3):345-51
2. Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, Asehnoune K, Fitting C, Pinsky MR, Dhainaut JF, Cavaillon JM. NF-kappaB expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1877-83.
3. Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol.* 2002;32(7):1958-68.
4. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-8.
5. An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J, Qin Z, Cao X. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology.* 2002;106(1):38-45.
6. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985;42(3):791-8.
7. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
8. Annane D, Sanquer S, Sebille V, Faye A, Djuranovic D, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet.* 2000;355(9210):1143-8.
9. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U. Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.* 1988;254(4 Pt 1):G471-6.
10. Ayala A, Xin Xu Y, Ayala CA, Sonefeld DE, Karr SM, Evans TA, Chaudry IH. Increased mucosal B-lymphocyte apoptosis during polymicrobial sepsis is a Fas ligand but not an endotoxin-mediated process. *Blood.* 1998;91(4):1362-72.
11. Bauer M, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology.* 1999;97(4):699-705.
12. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9237-42.
13. Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM, LeSauter L, Shah N, DeDionisio L, Christensen L, Raible A, Jarett L, Gewirtz AM. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest.* 1995;95(4):1814-23.
14. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978;24(1):58-73.
15. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344(10):699-709.
16. Bird AP. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(7):1499-504.
17. Bird AP. CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. *Trends Genet.* 1987;3:342-47
18. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16(1):6-21.
19. Bloch EH. The *in vivo* microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology.* 1955;6(4):340-9.
20. Boekstegers P, Weidenhofer S, Pilz G, Werdan K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection.* 1991;19(5):317-23.

21. Boer U, Fennekohl A, Puschel GP. Sensitization by interleukin-6 of rat hepatocytes to tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis. *J Hepatol.* 2003;38(6):728-35.
22. Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Tauber MG. Tumor necrosis factor- $\alpha$  contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis.* 1997;176(3):693-7.
23. Bohrer SL, Rogers EL, Koehler RC, Traystman RJ. Effect of hypovolemic hypotension and laparotomy on splanchnic and hepatic arterial blood flow in dogs. *Curr Surg.* 1981;38(5):325-8.
24. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1989;17(5):389-93.
25. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
26. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res.* 1987;42(5):565-9.
27. Brackett DJ, Hamburger SA, Lerner MR, Jones SB, Schaefer CF, Henry DP, Wilson MF. An assessment of plasma histamine concentrations during documented endotoxic shock. *Agents Actions.* 1990;31(3-4):263-74.
28. Brealey D, Brand M, Hargreaves I, Heales S, Land J, Smolenski R, Davies NA, Cooper CE, Singer M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. *Lancet.* 2002;360(9328):219-23.
29. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, Mercier JC, Offenstadt G, Regnier B. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA.* 1995;274(12):968-74.
30. Burkhardt M, Vollmar B, Menger MD. *In vivo* analysis of hepatic NADH fluorescence. Methodological approach to exclude Ito-cell vitamin A-derived autofluorescence. *Adv Exp Med Biol.* 1998;454:83-9.
31. Buttenschoen K, Berger D, Strecker W, Buttenschoen DC, Stenzel K, Pieper T, Beger HG. Association of endotoxemia and production of antibodies against endotoxins after multiple injuries. *J Trauma.* 2000;48(5):918-23.
32. Buttenschoen K, Buttenschoen DC, Berger D, Vasilescu C, Schafheutle S, Goeltenboth B, Seidelmann M, Beger HG. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am J Surg.* 2001;181(1):36-43.
33. Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF. Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock.* 2003;20(5):415-9.
34. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84(7):2068-101.
35. Carpentier AF, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2469-73.
36. Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? *Circ Shock.* 1992;38(2):145-52.
37. Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):535-44.
38. Chalfin DB, Holbein ME, Fein AM, Carlon GC. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. *JAMA.* 1993;269(2):249-54.
39. Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*. *Science.* 1962;137:499-508.
40. Chaudry IH, Hirasawa H, Baue AE. Impairment of reticuloendothelial system function with sepsis and its improvement with ATP-MgCl<sub>2</sub> plus glucose administration. *Adv Shock Res.* 1979;2:153-62.
41. Chen W, Yu Y, Shao C, Zhang M, Wang W, Zhang L, Cao X. Enhancement of antigen-presenting ability of B lymphoma cells by immunostimulatory CpG-oligonucleotides and anti-CD40 antibody. *Immunol Lett.* 2001;77(1):17-23.
42. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 1999;274(16):10689-10692.
43. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med.* 1997;186(10):1623-31.



44. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;15;326(Pt1):1-16.
45. Cohen J. Adjunctive therapy in sepsis: a critical analysis of the clinical trial programme. *Br Med Bull.* 1999;55(1):212-25.
46. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop.* 1991;(262):3-11.
47. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol.* 2004;24(6):693-701.
48. Crabtree TD, Jin L, Raymond DP, Pelletier SJ, Houlgrave CW, Gleason TG, Pruett TL, Sawyer RG. Pre-exposure of murine macrophages to CpG oligonucleotide results in a biphasic tumor necrosis factor  $\alpha$  response to subsequent lipopolysaccharide challenge. *Infect Immun.* 2001;69(4):2123-9.
49. Davila E, Velez MG, Heppelmann CJ, Celis E. Creating space: an antigen-independent, CpG-induced peripheral expansion of naive and memory T lymphocytes in a full T-cell compartment. *Blood.* 2002;100(7):2537-45.
50. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 1998;160(2):870-6.
51. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:98-104.
52. De Plaen IG, Tan XD, Chang H, Wang L, Remick DG, Hsueh W. Lipopolysaccharide activates nuclear factor kappaB in rat intestine: role of endogenous platelet-activating factor and tumour necrosis factor. *Br J Pharmacol.* 2000;129(2):307-14.
53. Delgado Hernandez R, Demitri MT, Carlin A, Meazza C, Villa P, Ghezzi P, Lipton JM, Catania A. Inhibition of systemic inflammation by central action of the neuropeptide  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. *Neuroimmunomodulation.* 1999;6(3):187-92.
54. Dhainaut JF, Marin N, Mignon A, Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S42-7.
55. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G. The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 1985;54(3):589-99.
56. Dijkstra CD, Dopp EA, Vogels IM, Van Noorden CJ. Macrophages and dendritic cells in antigen-induced arthritis. An immunohistochemical study using cryostat sections of the whole knee joint of rat. *Scand J Immunol.* 1987;26(5):513-23.
57. Eakes AT, Olson MS. Regulation of endothelin synthesis in hepatic endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(6 Pt 1):G1068-76.
58. Eaton-Bassiri A, Dillon SB, Cunningham M, Ryczyn MA, Mills J, Sarisky RT, Mbow ML. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 2004;72(12):7202-11.
59. Echtenacher B, Freudenberg MA, Jack RS, Mannel DN. Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. *Infect Immun.* 2001;69(12):7271-6.
60. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res.* 1982;10(8):2709-21.
61. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(5):G769-76.
62. El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin- $\alpha$ -mediated inhibition of hepatocyte necrapoptosis. *Hepatology.* 2004;39(6):1553-62.
63. Elkins KL, Rhinehart-Jones TR, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol.* 1999;162(4):2291-8.
64. Feng JM, Shi JQ, Liu YS. The effect of lipopolysaccharides on the expression of CD14 and TLR4 in rat Kupffer cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2003;2(2):265-9.
65. Ferrero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(6):2380-4.

66. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82(10):3170-6.
67. Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(26):1697-702.
68. Flohe S, Dominguez Fernandez E, Ackermann M, Hirsch T, Borgermann J, Schade FU. Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine*. 1999;11(10):796-804.
69. Freidag BL, Melton GB, Collins F, Klinman DM, Cheever A, Stobie L, Suen W, Seder RA. CpG oligodeoxynucleotides and interleukin-12 improve the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in mice challenged with *M. tuberculosis*. *Infect Immun*. 2000;68(5):2948-53.
70. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med*. 1998;26(12):2078-86.
71. Furuya K, Zhu L, Kawahara N, Abe O, Kirino T. Differences in infarct evolution between lipopolysaccharide-induced tolerant and nontolerant conditions to focal cerebral ischemia. *J Neurosurg*. 2005;103(4):715-23.
72. Gallay P, Heumann D, Le Roy D, Barras C, Glauser MP. Mode of action of anti-lipopolysaccharide-binding protein antibodies for prevention of endotoxemic shock in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(17):7922-6.
73. Gantner F, Hermann P, Nakashima K, Matsukawa S, Sakai K, Bacon KB. CD40-dependent and -independent activation of human tonsil B cells by CpG oligodeoxynucleotides. *Eur J Immunol*. 2003;33(6):1576-85.
74. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology*. 1998;27(6):1652-60.
75. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
76. Gelman SI. Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg*. 1976;111(8):881-3.
77. Gelman SI, Dillard E, Bradley EL Jr. Hepatic circulation during surgical stress and anesthesia with halothane, isoflurane, or fentanyl. *Anesth Analg*. 1987;66(10):936-43.
78. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, and Madara JL. Bacterial flagellin activates basolaterally expressed Tlr5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*. 2001;167:1882-85.
79. Goeckeritz BE, Flora M, Witherspoon K, Vos Q, Lees A, Dennis GJ, Pisetsky DS, Klinman DM, Snapper CM, Mond JJ. Multivalent cross-linking of membrane Ig sensitizes murine B cells to a broader spectrum of CpG-containing oligodeoxynucleotide motifs, including their methylated counterparts, for stimulation of proliferation and Ig secretion. *Int Immunol*. 1999;11(10):1693-700.
80. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN- $\beta$  (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*. 2004;173(5):2913-7.
81. Golenbock DT, Liu Y, Millham FH, Freeman MW, Zoeller RA. Surface expression of human CD14 in Chinese hamster ovary fibroblasts imparts macrophage-like responsiveness to bacterial endotoxin. *J Biol Chem*. 1993;268(29):22055-9.
82. Gramzinski RA, Doolan DL, Sedegah M, Davis HL, Krieg AM, Hoffman SL. Interleukin-12- and  $\gamma$  interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infect Immun*. 2001;69(3):1643-9.
83. Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(4):267-99.
84. Grube BJ, Cochane CG, Ye RD, Green CE, McPhail ME, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8477-82.
85. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001;33(2):397-405.
86. Gursel M, Verthelyi D, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides induce human monocytes to mature into functional dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(9):2617-22.
87. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):5-17.

88. Hacker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998;17(21):6230-40.
89. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.* 1994;179(1):269-77.
90. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol.* 2000;164(2):944-53.
91. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol.* 2000;164(3):1617-24.
92. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(6):1633-41.
93. Haziot A, Ferrero E, Lin XY, Stewart CL, Goyert SM. CD14-deficient mice are exquisitely insensitive to the effects of LPS. *Prog Clin Biol Res.* 1995;392:349-51.
94. Haziot A, Lin XY, Zhang F, Goyert SM. The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J Immunol.* 1998;160(6):2570-2.
95. Heckelsmiller K, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdorfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol.* 2002;169(7):3892-9.
96. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740-5.
97. Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol.* 1996;26(3):659-68.
98. Hewett JA, Jean PA, Kunkel SL, Roth RA. Relationship between tumor necrosis factor- $\alpha$  and neutrophils in endotoxin-induced liver injury. *Am J Physiol.* 1993;265(6 Pt 1):G1011-5.
99. Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 2001;69(3):1477-82.
100. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 1999;284(5418):1313-8.
101. Holub M, Kluckova Z, Helcl M, Prihodov J, Rokyta R, Beran O. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(3):202-11.
102. Hopf U, Moller B, Stemerowicz R, Lobeck H, Rodloff A, Freudenberg M, Galanos C, Huhn D. Relation between *Escherichia coli* R(rough)-forms in gut, lipid A in liver, and primary biliary cirrhosis. *Lancet.* 1989;2(8677):1419-22.
103. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med.* 1999;27(7):1230-51.
104. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE Jr, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001;166(11):6952-63.
105. Hu Z, Sun S, Zhou F. The binding of CpG-oligodeoxynucleotides to cell-surface and its immunostimulatory activity are modulated by extracellular acidic pH. *Vaccine.* 2003;21(5-6):485-90.
106. Isaka T, Maruno M, Muhammad AK, Kato A, Nakagawa H, Yoshimine T. Ultrastructural changes of the vascular endothelium after intra-arterial administration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in rat gliomas. *J Neurooncol.* 2000;46(2):145-50.
107. Jaeschke H, Farhood A, Cai SX, Tseng BY, Bajt ML. Protection against TNF-induced liver parenchymal cell apoptosis during endotoxemia by a novel caspase inhibitor in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;169(1):77-83.
108. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophil-induced liver cell injury in endotoxin shock is a CD11b/CD18-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1991;261(6 Pt 1):G1051-6.

109. Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- $\alpha$ -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol*. 1998;160(7):3480-6.
110. Jaeschke H, Gujral, JS, Bucci TJ, Farhood A. Reply to: Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology*. 2001;33(6):1555-1557
111. Jiang J, Xie G, Chen Y, Liu D, Qiu J, Zhou J, Zhu P, Wang Z. Intra-hepatic expression of scavenger receptor and CD14 and their relationship with local inflammatory responses in endotoxemia in mice. *Shock*. 2001;16(1):75-80.
112. Jiang JX, Zhang Y, Ji SH, Zhu P, Wang ZG. Kinetics of mitogen-activated protein kinase family in lipopolysaccharide-stimulated mouse Kupffer cells and their role in cytokine production. *Shock*. 2002;18(4):336-41.
113. Jin L, Raymond DP, Crabtree TD, Pelletier SJ, Rudy CK, Pruett TL, Sawyer RG. Preexposure of murine macrophages to CpG-containing oligonucleotides results in nuclear factor kappaB p50 homodimer-associated hyporesponsiveness. *Surgery*. 2002;132(2):245-51. 61.
114. Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigallo E, Amati L, Lembo A, Kalis C, Gumenscheimer M. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res*. 2002;8(5):319-27.
115. Josephs MD, Bahjat FR, Fukuzuka K, Ksontini R, Solorzano CC, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, MacKay SL, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Lipopolysaccharide and D-galactosamine-induced hepatic injury is mediated by TNF- $\alpha$  and not by Fas ligand. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;278(5):R1196-201.
116. Josse J, Kaiser AD, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VIII. Frequencies of nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem*. 1961;236:864-75.
117. Kajikawa S, Kaga N, Futamura Y, Kakinuma C, Shibutani Y. Lipoteichoic acid induces preterm delivery in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998;39(3):147-54.
118. Karwinski W, Husoy AM, Farstad M, Soreide O. Sixty minutes of normothermic ischemia in the rat liver: correlation between adenine nucleotides and bile excretion. *J Surg Res*. 1989;46(2):99-103.
119. Keller GA, West MA, Cerra FB, Simmons RL. Macrophage-mediated modulation of hepatic function in multiple-system failure. *J Surg Res*. 1985;39(6):555-63.
120. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2003;170(9):4465-74.
121. Kimura Y, Sonehara K, Kuramoto E, Makino T, Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Tokunaga T. Binding of oligoguanylate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J Biochem (Tokyo)*. 1994;116(5):991-4.
122. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon  $\gamma$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2879-83.
123. Klinman DM, Currie D. Hierarchical recognition of CpG motifs expressed by immunostimulatory oligodeoxynucleotides. *Clin Exp Immunol*. 2003;133(2):227-32.
124. Klintman D, Schramm R, Menger MD, Thorlacius H. Leukocyte recruitment in hepatic injury: selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependent firm adhesion. *J Hepatol*. 2002;36(1):53-9.
125. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev*. 2000;174:21-34.
126. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*. 1999;67(8):1099-105.
127. Kreymann G, Grosser S, Buggisch P, Gottschall C, Matthaei S, Greten H. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Crit Care Med*. 1993;21(7):1012-9.
128. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
129. Krieg AM, Matson S, Fisher E. Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 1996;6(2):133-9.
130. Krieg AM, Wu T, Weeratna R, Efler SM, Love-Homan L, Yang L, Yi AK, Short D, Davis HL. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12631-6.
131. Krieg AM. Signal transduction induced by immunostimulatory CpG DNA. *Springer Semin Immunopathol*. 2000;22(1-2):97-105.

132. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2154-63.
133. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol.* 2001;31(10):3026-37.
134. Krug A, Rothenfusser S, Selinger S, Bock C, Kerkmann M, Battiany J, Sarris A, Giese T, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A oligonucleotides induce a monocyte-derived dendritic cell-like phenotype that preferentially activates CD8 T cells. *J Immunol.* 2003;170(7):3468-77.
135. Larsen JA, Krarup N, Munck A. Liver hemodynamics and liver function in cats during graded hypoxic hypoxemia. *Acta Physiol Scand.* 1976;98(2):257-62.
136. Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res.* 2004;10(6):406-12.
137. Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology.* 1998;28(3):761-7.
138. Lee SM, Park MJ, Cho TS, Clemens MG. Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion. *Shock.* 2000;13(4):279-84.
139. Leifer CA, Verthelyi D, Klinman DM. Heterogeneity in the human response to immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunother.* 2003;26(4):313-9.
140. Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol.* 2004;173(2):1179-83.
141. Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A. Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am J Pathol.* 1995;146(5):1220-34.
142. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA.* 1993;270(8):975-9.
143. Li X, Klintman D, Weitz-Schmidt G, Schramm R, Thorlacius H. Lymphocyte function antigen-1 mediates leukocyte adhesion and subsequent liver damage in endotoxemic mice. *Br J Pharmacol.* 2004;141(4):709-16.
144. Liang H, Reich CF, Pisetsky DS, Lipsky PE. The role of cell surface receptors in the activation of human B cells by phosphorothioate oligonucleotides. *J Immunol.* 2000;165(3):1438-45.
145. Lipford GB, Sparwasser T, Bauer M, Zimmermann S, Koch ES, Heeg K, Wagner H. Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3420-6.
146. Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, Gambotto AA, Humphris EL, Vodovotz Y, Billiar TR. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 2002;70(7):3433-42.
147. Ljunghusen O, Lundahl J, Nettelblad H, Nilsson B, Sjogren F, Stendahl O. Endotoxemia and complement activation after severe burn injuries--effects on leukocytes, soluble selectins, and inflammatory cytokines. *Inflammation.* 1996;20(3):229-41.
148. Longnecker DE, Seyde WC. Anesthetic regimes : Advantages and disadvantages. In *Microcirculatory technology* (Eds. Baker CH, Nastuk WL), 343-65, Academic Press, Orlando, 1986
149. Luderitz O, Staub AM, Westphal O. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related Enterobacteriaceae. *Bacteriol Rev.* 1966;30(1):192-255.
150. Lundsgaard-Hansen P, Pappova E, Urbaschek B, Heitmann L, Laederach A, Molnes N, Oroz M, Wirth U. Circulatory deterioration as the determinant of energy metabolism in endotoxin shock. *J Surg Res.* 1972;13(6):282-8.
151. Macfarlane DE, Manzel L. Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* 1998;160(3):1122-31.
152. Marie C, Muret J, Fitting C, Losser MR, Payen D, Cavaillon JM. Reduced ex vivo interleukin-8 production by neutrophils in septic and nonseptic systemic inflammatory response syndrome. *Blood.* 1998;91(9):3439-46.

153. Marshall JD, Fearon K, Abbate C, Subramanian S, Yee P, Gregorio J, Coffman RL, Van Nest G. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):781-92.
154. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-54.
155. Mas A, Rodes J. Fulminant hepatic failure. *Lancet.* 1997;349(9058):1081-5.
156. Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology.* 2000;32(5):1008-17.
157. Mavrier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. *In vitro* toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology.* 1988;8(2):254-8.
158. McCuskey RS. A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat.* 1966;119(3):455-77.
159. McCuskey RS. Microscopic studies for studying the microvasculature of internal organs, in *Physical Techniques in Biology and Medicine Microvascular Technology* (Eds. Baker CH, Nastuk WL), Academic Press, New York, 1986, pp 247-64.
160. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 1997;91(3):295-8.
161. Meng X, Khanuja BS, Ip YT. Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev.* 1999;13(7):792-7.
162. Menger MD, Marzi I, Messmer K. *In vivo* fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res.* 1991;23(3-4):158-69.
163. Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from *in vitro* to *in vivo*. *Immunol Today.* 1993;14(11):519-22.
164. Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST, Arthur K, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery.* 1988;104(2):280-6.
165. Miconnet I, Koenig S, Speiser D, Krieg A, Guillaume P, Cerottini JC, Romero P. CpG are efficient adjuvants for specific CTL induction against tumor antigen-derived peptide. *J Immunol.* 2002;168(3):1212-8.
166. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003;31(7):2068-71.
167. Morin D, Pires F, Plin C, Tillement JP. Role of the permeability transition pore in cytochrome C release from mitochondria during ischemia-reperfusion in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(10):2065-73.
168. Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2004;8(1):83-94.
169. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1747-54.
170. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. *J Endotoxin Res.* 2001;7(4):297-300.
171. Nakamura T, Ueno Y, Goda Y, Nakamura A, Shinjo K, Nagahisa A. Efficacy of a selective histamine H2 receptor agonist, dimaprit, in experimental models of endotoxin shock and hepatitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 1997;322(1):83-9.
172. Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y. Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology.* 1986;6(4):701-7.
173. Nolan JP, Camara DS. Intestinal endotoxins as co-factors in liver injury. *Immunol Invest.* 1989;18(1-4):325-37.
174. Nolan JP, O'Connell CJ. Vascular response in the isolated rat liver. I. Endotoxin, direct effects. *J Exp Med.* 1965;122(6):1063-73.
175. Nolan JP. The role of endotoxin in liver injury. *Gastroenterology.* 1975;69(6):1346-56.
176. Oxenius A, Martinic MM, Hengartner H, Klenerman P. CpG-containing oligonucleotides are efficient adjuvants for induction of protective antiviral immune responses with T-cell peptide vaccines. *J Virol.* 1999;73(5):4120-6.
177. Pappova E, Urbaschek B, Heitmann L, Oroz M, Streit E, Lemeunier A, Lundsgaard-Hansen P. Energy-rich phosphates and glucose metabolism in early endotoxin shock. *J Surg Res.* 1971;11(10):506-12.

178. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, McCabe C, Welch SB, Whitney A, O'Gara P, Nadel S, Relman DA, Harding SE, Levin M. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004;363(9404):203-9.
179. Penna G, Vulcano M, Roncari A, Facchetti F, Sozzani S, Adorini L. Differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2002;169(12):6673-6.
180. Petruccio O, Rao PS, Cavanagh D. Endotoxin shock in the dog. Alterations in hemodynamic and hematologic parameters during bolus and infusion studies. *Am J Obstet Gynecol*. 1972;114(8):1060-5.
181. Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD. Assessment of hepatic phagocytic activity by *in vivo* microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology*. 1992;16(3):803-9.
182. Postel J, Schloerb PR, Furtado D. Pathophysiologic alterations during bacterial infusions for the study of bacteremic shock. *Surg Gynecol Obstet*. 1975;141(5):683-92.
183. Pratesi G, Petrangolini G, Tortoreto M, Addis A, Belluco S, Rossini A, Selleri S, Rumio C, Menard S, Balsari A. Therapeutic synergism of gemcitabine and CpG-oligodeoxynucleotides in an orthotopic human pancreatic carcinoma xenograft. *Cancer Res*. 2005;65(14):6388-93.
184. Ramsahoye BH, Davies CS, Mills KI. DNA methylation: biology and significance. *Blood Rev*. 1996;10(4):249-61.
185. Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5237-42.
186. Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec*. 1958;130(4):673-89.
187. Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res*. 1973;6(2):212-28.
188. Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat*. 1977;(16 Pt 2):116-20.
189. Renault G, Muffat-Joly M, Polianski J, Hardy RI, Boutineau JL, Duvent JL, Pocidalo JJ. NADH in situ laser fluorimetry: effect of pentobarbital on continuously monitored myocardial redox state. *Lasers Surg Med*. 1987;7(4):339-46.
190. Ring A, Stremmel W. The hepatic microvascular responses to sepsis. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(5):589-94.
191. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, Towarowski A, Krieg AM, Endres S, Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human  $\gamma \delta$  T cells via interferon- $\alpha/\beta$ . *Eur J Immunol*. 2001;31(12):3525-34.
192. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol*. 2002;63(12):1111-9.
193. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg*. 2003;16(3):149-59.
194. Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B. Inhibition of p53 protects liver tissue against endotoxin-induced apoptotic and necrotic cell death. *FASEB J*. 2003;17(6):660-7.
195. Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dtsch Ges Inn Med*. 1914;31:257-80
196. Schuchmann M, Hermann F, Herkel J, van der Zee R, Galle PR, Lohse AW. HSP60 and CpG-DNA-oligonucleotides differentially regulate LPS-tolerance of hepatic Kupffer cells. *Immunol Lett*. 2004;93(2-3):199-204.
197. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1429-31.
198. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999;274(25):17406-9.
199. Schwarz NT, Engel B, Eskandari MK, Kalff JC, Grandis JR, Bauer AJ. Lipopolysaccharide preconditioning and cross-tolerance: the induction of protective mechanisms for rat intestinal ileus. *Gastroenterology*. 2002;123(2):586-98.
200. Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon  $\gamma$  production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(21):10188-92.
201. Severn A, Rapson NT, Hunter CA, Liew FY. Regulation of tumor necrosis factor production by adrenaline and  $\beta$ -adrenergic agonists. *J Immunol*. 1992;148(11):3441-5.

202. Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, Orlikowski D, Raphael JC, Gajdos P, Annane D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet*. 2003;362(9398):1799-805.
203. Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood*. 2001;98(4):1226-30.
204. Short A, Wong AK, Finch AM, Haaime G, Shiels IA, Fairlie DP, Taylor SM. Effects of a new C5a receptor antagonist on C5a- and endotoxin-induced neutropenia in the rat. *Br J Pharmacol*. 1999;126(3):551-4.
205. Singer M, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004;364(9433):545-8.
206. Smith RL, Chong TW, Hughes MG, Hedrick TL, Evans HL, McElearney ST, Saalwachter AR, Raymond DP, Du K, Rudy CK, Pruett TL, Sawyer RG. Impact of immunomodulatory oligodeoxynucleotides on cytokine production in the lipopolysaccharide-stimulated human whole blood model. *Surgery*. 2004;136(2):464-72.
207. Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*. 1997;386(6623):336-7.
208. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1998;28(6):2045-54.
209. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells *in vivo*: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol*. 2000;30(12):3591-7.
210. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*. 1996;157(5):2116-22.
211. Stacey KJ, Young GR, Clark F, Sester DP, Roberts TL, Naik S, Sweet MJ, Hume DA. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J Immunol*. 2003;170(7):3614-20.
212. Su GL, Goyert SM, Fan MH, Aminlari A, Gong KQ, Klein RD, Myc A, Alarcon WH, Steinstraesser L, Remick DG, Wang SC. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002a;283(3):G640-5.
213. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002b;283(2):G256-65.
214. Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M. Intravital and electron microscopic observation of Ito cells in rat hepatic microcirculation. *Microvasc Res*. 1993;46(1):28-42.
215. Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K. Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation*. 1988;46(4):506-9.
216. Sun S, Beard C, Jaenisch R, Jones P, Sprent J. Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol*. 1997;159(7):3119-25.
217. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 1999;162(10):6284-93.
218. Swartz MN, Trautner TA, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XI. Further studies on nearest neighbor base sequences in deoxyribonucleic acids. *J Biol Chem*. 1962;237:1961-7.
219. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*. 2001;167(7):3555-8.
220. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene*. 1999;231(1-2):59-65.
221. Tanaka H, Sugimoto H, Yoshioka T, Sugimoto T. Role of granulocyte elastase in tissue injury in patients with septic shock complicated by multiple-organ failure. *Ann Surg*. 1991;213(1):81-5.
222. Thurman RG. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 1):G605-11.
223. Tiegs G, Wolter M, Wendel A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(4):627-31.
224. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984;72(4):955-62.



225. Tomita M, Yamamoto K, Kobashi H, Ohmoto M, Tsuji T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology* 1994;20:317-325.
226. Tracy TF, Fox ES. CD14-lipopolysaccharide receptor activity in hepatic macrophages after cholestatic liver injury. *Surgery* 1995;118:371-77
227. Utaisincharoen P, Anuntagool N, Chaisuriya P, Pichyangkul S, Sirisinha S. CpG ODN activates NO and iNOS production in mouse macrophage cell line (RAW 264.7). *Clin Exp Immunol.* 2002;128(3):467-73.
228. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1359-67.
229. van Deventer SJ, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood.* 1990;76(12):2520-6.
230. van Deventer SJ, Pajkrt D. Neutrophil adhesion molecules and MOF. *Intensive Care Med.* 1997;23(5):487-8.
231. Vijiuk N, Kosuta D, Basic I, Valpotic I. *In vivo* modulating effects of bacterial peptidoglycans on PHA-induced responses of porcine PBL and splenocytes. *Immunobiology.* 1993;188(3):274-80.
232. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg.* 1992;75(3):421-30.
233. Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir.* 1993;118(11):691-6.
234. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol.* 1994a;20(2):301-4.
235. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1994b;267(5 Pt 1):G786-93.
236. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 1994c;145(6):1421-31.
237. Vollmar B, Senkel A, Menger MD. *In vivo* evidence that intercellular adhesion molecule-1 does not mediate endotoxin-induced hepatic leukocyte-endothelial cell interaction. *J Hepatol.* 1995;23(5):613-6.
238. Vollmar B, Ruttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock.* 1996;6(6):434-41.
239. Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for *in vivo* monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res.* 1997;54(2):164-73.
240. Vollmar B, Bauer C, Menger MD. n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. *Crit Care Med.* 2002;30(5):1091-8.
241. von Allmen D, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Fischer JE. Individual regulation of different hepatocellular functions during sepsis. *Metabolism.* 1992;41(9):961-9.
242. Wan Y, Freeswick PD, Khemlani LS, Kispert PH, Wang SC, Su GL, Billiar TR. Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect Immun.* 1995;63(7):2435-42.
243. Warren TL, Dahle CE, Weiner GJ. CpG oligodeoxynucleotides enhance monoclonal antibody therapy of a murine lymphoma. *Clin Lymphoma.* 2000;1(1):57-61.
244. Weigel BJ, Rodeberg DA, Krieg AM, Blazar BR. CpG oligodeoxynucleotides potentiate the antitumor effects of chemotherapy or tumor resection in an orthotopic murine model of rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(8):3105-14.
245. Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol.* 2000;165(8):4537-43.
246. Wloch MK, Pasquini S, Ertl HC, Pisetsky DS. The influence of DNA sequence on the immunostimulatory properties of plasmid DNA vectors. *Hum Gene Ther.* 1998;9(10):1439-47.
247. Wood JJ, Rodrick ML, O'Mahony JB, Palder SB, Saporoschetz I, D'Eon P, Mannick JA. Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann Surg.* 1984;200(3):311-20.

- 
248. Wooldridge JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood*. 1997;89(8):2994-8.
  249. Wortha HP, Adams J. Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In *Einführung in die medizinische Biometrie* (Ed. Adams J.), Gustav Fischer, Jena, 1992, pp 18-19.
  250. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.
  251. Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryté AS, Yurchenko LV, Vlassov VV. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(17):6454-8.
  252. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol*. 1992;36(9):983-97.
  253. Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol*. 1998;160(12):5898-906.
  254. Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol*. 1998;161(9):4493-7.
  255. Yu D, Kandimalla ER, Zhao Q, Cong Y, Agrawal S. Immunostimulatory properties of phosphorothioate CpG DNA containing both 3'-5'- and 2'-5'-internucleotide linkages. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(7):1613-9.
  256. Zhao Q, Waldschmidt T, Fisher E, Herrera CJ, Krieg AM. Stage-specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B-cell precursors. *Blood*. 1994;84(11):3660-6.
  257. Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS. The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology*. 2001;103(2):226-34.
  258. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645-54.
  259. Zimmerman S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Röcken M, Wagner H, Heeg K. CpG oligonucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J. Immunol*. 1998;160:3627-30

## 9 DANKSAGUNG

Ohne die Hilfe und Unterstützung folgender Personen wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit unmöglich gewesen:

Mein besonderer Dank gebührt *Herrn Professor Menger*, dem Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, für die Überlassung des Themas sowie die Förderung der Arbeit.

Ebenso danke ich *Frau Professor Vollmar*, der Leiterin der Abteilung für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für ihre intensive Betreuung und ihre ständige Hilfsbereitschaft bei der Versuchsplanung, bei der Durchführung der Experimente, sowie bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse. Zusammen mit Herrn Professor Menger hat sie mich wissenschaftliches Arbeiten gelehrt, durch positive Kritik und Ermutigung zur Eigeninitiative meine Motivation sowie mein wissenschaftliches Interesse gestärkt und gefördert. Ebenso haben mir Frau Prof. Vollmar und Herr Prof. Menger die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen ermöglicht, und mich auf diese ausgezeichnet vorbereitet.

Mein weiterer Dank gilt *Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer* für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen. Durch ihre stetige Hilfsbereitschaft bezüglich der Interpretation von Ergebnissen, Vorbereitung von Reagenzien, sowie tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente hat mir Frau Scheuer bedeutsam bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen.

Des Weiteren möchte ich mich bei *Frau J. Becker* und *Frau E. Gluding* für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der Leberhistologien, sowie ihre stetige Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit bedanken. Ebenso möchte ich *Herrn T. Schäfer* danken, der mich mit viel Geduld und fachlicher Kompetenz die chirurgische Präparation der Versuchstiere, die Durchführung der Intravitalmikroskopie, sowie die Durchführung der Auswertungen gelehrt hat.

Zuletzt danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir immer wieder zuteil wurden. Sie haben einen großen Anteil an der entspannten Atmosphäre in dieser Abteilung geleistet, die ich während der gesamten Zeit dort genießen durfte.

## 10 PUBLIKATIONEN

### Originalpublikationen

VOLLMAR B., SLOTTA JE., NICKELS RM., WENZEL E, MENDER MD.: Comparative analysis of platelet isolation techniques for the *in vivo* study of the microcirculation.  
*Microcirculation*, 10(2):143-52; 2003.

SLOTTA JE., SCHEUER C., MENDER MD., VOLLMAR B.: Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage.  
*J Hepatol*, 44(3):576-85; 2006.

THORLACIUS K., SLOTTA JE., LASCHKE MW, WANG Y., MENDER MD., JEPSSON B., THORLACIUS H.: Protective Effect of Fasudil, a Rho-Kinase Inhibitor, on Chemokine Expression, Leukocyte Recruitment and Hepatocellular Apoptosis in Septic Liver Injury.  
*J Leukoc Biol*, 79(5):923-31; 2006.

SLOTTA JE., BRAUN OÖ., MENDER MD., THORLACIUS H.: Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels *in vivo*.  
[*Inflamm Res*, accepted]

### Kongressbeiträge

120. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:

SLOTTA JE., MENDER MD., VOLLMAR B.: Immunstimulierende CpG-Oligodeoxynukleotide reduzieren die hepatozelluläre Apoptose und die Leberdysfunktion während Endotoxämie.  
*Chir Forum (Springer)*, 32:323-325, 2003

121. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie:

SLOTTA JE., SCHILLING MK., MENDER MD., VOLLMAR B.: Immunstimulierende CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG-ODN) reduzieren die Störung der Mikrozirkulation, nicht aber die hepatozelluläre Exkretionsfunktion der post-ischämischen Rattenleber.  
*Chir Forum (Springer)*, 33:293-294, 2004

SCHEINGRABER S., ÖHRLEIN R., SLOTTA JE., BAUER M., PISTORIUS GA., WOLFF M.: Funktionelle Bedeutung der Hämoxygenase-1 Aktivität für die Lebermikrozirkulation bei Cholestase.  
*Chir Forum (Springer)*, 33:327-329, 2004

122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:

BURKHARDT M., SLOTTA JE., POHLEMAN T., MENDER MD., SEEKAMP A.: Der Effekt von Östrogen auf die hepatische Mikrozirkulation während Ischämie/Reperfusion.  
*Chir Forum (Springer)*, 34: 291-293, 2005

#### 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:

SLOTTA JE., THORLACIUS K., LASCHKE MW., WANG Y., JEPPSSON B., THORLACIUS H., MENDER MD.:

Rho-Kinase vermittelt über Expression von TNF- $\alpha$  und CXC Chemokine die Leukozyten-Rekrutierung und die hepatozelluläre Apoptose bei septischem Leberschaden.

*Chir Forum (Springer)*, 35: 247-248, 2006

#### 54. Jahrestagung der Vereinigung Süddeutscher Orthopäden e.V.:

CLAUSS M., SLOTTA JE., GRABER P., OCHSNER P.:

Einsatz des Cell-Savers im Rahmen septischer Hüfttotalprothesenrevisionen. Ergebnisse einer retrospektiven Pilotstudie.

#### 41. Congress of the European Society for Surgical Research:

SLOTTA JE., THORLACIUS K., LASCHKE MW., WANG Y., MENDER MD., JEPPSSON B., THORLACIUS H.:

Protective effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, on chemokine expression, leukocyte recruitment and hepatocellular apoptosis in septic liver injury.

*Eur Surg Res*, 38(S1): 88-89, 2006

#### 10. Chirurgische Forschungstage:

SLOTTA JE., BRAUN OÖ., THORLACIUS H., MENDER MD.:

Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, inhibits leukocyte adhesion in inflamed large blood vessels *in vivo*.

*Langenbecks Arch Surg*, 391(5): 526, 2006

#### Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und vaskuläre Biologie e.V. 2006:

SLOTTA JE., BRAUN OÖ., MENDER MD., THORLACIUS H.:

Platelet recruitment to the venous endothelium is critically dependent on CD62 and CD162 during endotoxemia.

# 11 VITA

<b>Name</b>	Slotta
<b>Vorname</b>	Jan Erik
<b>Geburtsort</b>	Mainz
<b>Geburtsdatum</b>	21.01.1979
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Eltern</b>	Henning Slotta: Schulleiter Grundschule Hornbach Roswitha Slotta, geb. Fegert: Konrektorin Grundschule Kirchberg, Saarbrücken
<b>Geschwister</b>	Jörn Gunnar Slotta, * 11.05.1982 in Saarbrücken; Student an der Universität des Saarlandes: Chemie und Geographie für Lehramt Sekundarstufe II
<b>Schulbildung</b>	1985 – 1989 Grundschule Ommersheim 1989 – 1998 Albertus Magnus Gymnasium, St. Ingbert
<b>Wehrdienst</b>	07/1998 – 04/1999 (Marineunteroffiziersschule Plön, Gorch Fock, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München)
<b>Studium</b>	09/1999 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar 08/2001 Physikum (Note 2) 08/2002 1. Staatsexamen (Note 3) 08/2004 2. Staatsexamen (Note 3) 10/2005 3. Staatsexamen (Note 1)
<b>Promotionen</b>	10/2003 Beginn der Promotionsarbeit im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, <i>Leiter</i> : Prof. Dr. med. M. D. Menger, Betreuung: Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar Seit 2005 im PhD-Programm der Universität Lund, Schweden
<b>Weiterbildung</b>	01.01. – 31.07.2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. M.D. Menger) der Universität des Saarlandes.  seit 01.08.2006 Assistent der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. M.K. Schilling) der Universität des Saarlandes.